Aus dem Physiologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. Otto H. Gauer

DIE FREISETZUNG VON ACETYLCHOLIN DURCH DIE MOTORISCHEN NERVENENDIGUNGEN

Deutung experimenteller Befunde durch ein Analogmodell

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Me dizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Kruckenberg, Peter

aus Berlin

1968

Dekan: Professor Dr.med. Hans Wolfgang S p i e r

Referent: Professor Dr.med. Otto H. G a u e r

Korreferent: Professor Dr.med.Dr.rer.nat. Günter F u c h s

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 10. Juli 1968

Sonderdruck
aus „Kybernetik", 4. Band, 4. Heft, April 1968, S. 113—130
Springer-Verlag, Berlin · Heidelberg · New York

Die Freisetzung von Acetylcholin durch die motorischen Nervenendigungen

Deutung experimenteller Befunde durch ein Analogmodell

Peter Kruckenberg *
Physiologisches Institut der Universität Berlin

Eingegangen am 7. September 1967

Summary. 1. Hypotheses concerning the transport of acethylcholine (Ach) and of changes in the coefficient of release during and after repetitive stimulation are presented. These hypotheses are based on the conception that an action potential releases a certain amount of immediately available Ach from a reservoir at the motor nerve ending.

2. Corresponding to these hypotheses an electrical analog model was conceived. The differential equations deduced from the model were programmed on an analog computer.

3. The changes in Ach-release during and after repetitive stimulation, known from biological experiments either with Curare- or with Magnesium-blocked preparations, could be reproduced qualitatively when changing only one parameter of the model.

4. For the purposes of quantitative simulation, data from various biological experiments, partly from other authors, partly from our own laboratory, were used. In most of the experiments the curves derived from the model are found to be within the standard deviation of the biological data.

5. It is concluded that a system of lesser complexity does not equally well lead to a simulation of the biological data.

6. The analog relationships between the model and the biological processes are discussed. By use of the model it may be possible to simulate the release of transmitter at other synapses too.

1. Einleitung

Die Erregungsübertragung an den meisten bisher untersuchten Synapsen erfolgt auf chemischem Wege: Ein Aktionspotential (AP) in der präsynaptischen Nervenendigung bewirkt die Freisetzung einer Überträgersubstanz. Dieser Transmitter ruft an der postsynaptischen Membran eine Permeabilitätsänderung hervor, die gewöhnlich zu einer Änderung des Membranpotentials führt, einem excitatorischen oder inhibitorischen postsynaptischen Potential. Eine Depolarisation, die das kritische Schwellenpotential der postsynaptischen Membran erreicht, bewirkt dort ein fortgeleitetes AP.

Bei der Untersuchung der Signalübertragung durch Synapsen werden gewöhnlich die postsynaptisch gemessenen Potentialveränderungen zur präsynaptischen AP-Folge in Beziehung gesetzt. Bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch zu berücksichtigen, daß die in den präsynaptischen Nervenendigungen einlaufende Information dort noch einmal moduliert wird, wenn die pro AP freigesetzte Transmittermenge nicht konstant ist.

An der neuromuskulären Synapse, der motorischen Endplatte, ist die experimentelle Differenzierung zwischen prä- und postsynaptischen Veränderungen relativ gut möglich. Die Freisetzung des Überträgerstoffes Acetylcholin (Ach) erfolgt in Form ganzzahliger Vielfacher eines sog. Ach-Quants [7, 14, 45, 50, 51].

Die einem Quant entsprechende Ach-Menge ist für eine motorische Nervenendigung bei den meisten Versuchsbedingungen recht konstant [17, 18, 35]. Die Zahl der Ach-Quanten, die einem bestimmten excitatorischen Potential (Endplattenpotential, EPP) entspricht, läßt sich durch verschiedene Verfahren ermitteln [51] und ist ein lineares Maß für die Ach-Freisetzung durch die motorische Nervenendigung. Durch Veränderung der Ca- und Mg-Konzentration in der Blutersatzlösung kann die Anzahl der durch ein einzelnes AP freigesetzten Ach-Quanten zwischen weniger als einem und mehreren hundert variiert werden, und zwar ist die Quantenzahl um so niedriger, je höher die Mg- und je niedriger die Ca-Konzentration ist [12, 14, 15, 22, 34, 62]. Außerdem sind während und nach frequenter Reizung des motorischen Nerven charakteristische Veränderungen der Quantenzahl pro Reiz beobachtet worden: Bei initial hoher Quantenzahl tritt im Verlauf einer tetanischen Reizung eine Depression der EPPs auf, die auf eine Verminderung der Zahl der freigesetzten Quanten zurückzuführen ist [11, 15, 22, 26, 28, 29, 45, 47, 48, 54, 60]. Dagegen bewirkt tetanische Reizung bei initial niedriger Quantenzahl eine Bahnung, d.h. eine Zunahme der Quantenzahl pro AP [15, 22, 29, 45, 49]. In beiden Fällen findet man nach längeren, hochfrequenten Reizserien eine langanhaltende posttetanische Potenzierung (PTP) der Endplattenpotentiale, die ebenfalls präsynaptischen Ursprungs ist [8, 27, 29, 33, 45, 47].

Mehrere Autoren haben versucht, aus diesen Phänomenen Rückschlüsse auf die funktionelle Organisation der motorischen Nervenendigungen zu ziehen. Liley u. North [47] haben 1953 nach extracellulären Ableitungen am Gesamtmuskel ein relativ kleines Reservoir an freiem, für die Freisetzung verfügbarem Ach gefordert, das bereits durch einen Einzelreiz deutlich vermindert werden kann, sowie einen sehr viel größeren Speicher, aus dem dieses Reservoir ständig aufgefüllt wird und der selbst nur durch prolongierte Reizung entleert werden kann. Andere Untersucher [22, 60] sind diesen Vorstellungen gefolgt, und Birks u. MacIntosh [5, 6] haben ein ähnliches Modell für die Nervenendigungen im synaptischen Ganglion vorgeschlagen. Über die Ursache der Bahnungsvorgänge gibt es unterschiedliche Auffassungen. Sie werden entweder als Folge einer „Mobilisation" von Überträgerstoff [8, 29, 35] oder einer Verstärkung des Freisetzungsmechanismus [15, 47, 62] gedeutet.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ga 37/15).

Wir stellten uns in dieser Arbeit folgende Aufgaben:

1. Auf der Grundlage anschaulicher Hypothesen soll ein Modell entwickelt werden, das die aus biologischen Experimenten bekannten Änderungen der Ach-Freisetzung durch ein Aktionspotential während und nach frequenter Reizung sowohl bei initial hoher wie auch bei initial niedriger Quantenzahl reproduzieren kann.

2. Es soll geprüft werden, ob sich eine quantitative Übereinstimmung der Ergebnisse von unterschiedlichen biologischen Experimenten und entsprechenden Modellversuchen erzielen läßt.

3. Schließlich ist zu diskutieren, inwieweit aus dem Modell Erkenntnisse über Wirkungsbeziehungen in der motorischen Nervenendigung gewonnen werden können.

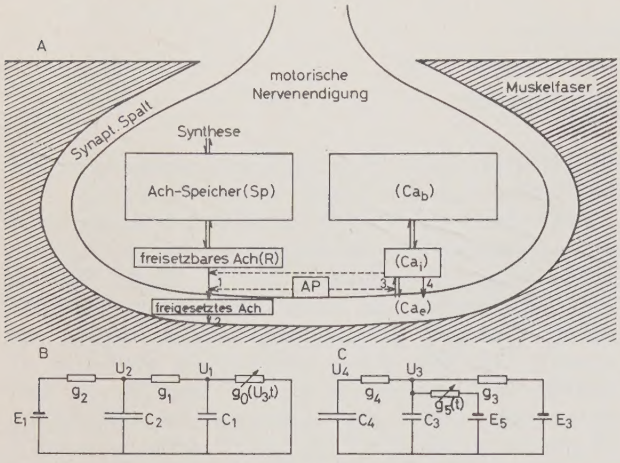

Abb. 1. A Schematische Darstellung des Modells einer motorischen Nervenendigung mit den verschiedenen Kompartimenten für Ach bzw. Calcium. Durch ein AP wird aus dem Reservoir an freisetzbarem Ach (R) ein bestimmter Anteil freigesetzt, der von der Ca-Konzentration an der Innenseite der Membran (Ca_i) abhängt (1). Das freigesetzte Ach (Q) bewirkt an der postsynaptischen Membran eine Depolarisation (2). Das Reservoir R wird aus einem viel größeren Speicher (Sp) und dieser wiederum durch die Transmittersynthese aufgefüllt. (Ca_i) ist infolge eines aktiven Ca-Transportes nach außen (4) niedriger als die extracelluläre Ca-Konzentration (Ca_e). Ein AP bewirkt weiterhin eine Erhöhung der Ca-Permeabilität und damit einen Ca-Einstrom. Für das intracelluläre Calcium existiert ein weiterer, größerer Verteilungsraum, dessen Ca-Konzentration (Ca_b) im Gleichgewicht gleich (Ca_i) ist. B, C: Elektrische Analogschaltbilder für den Ach-Fluß (B), bzw. den Ca-Fluß (C), entsprechend der im Text ausgeführten Hypothesen (1) bis (7). Bezüglich der Analogiebeziehungen s. Tabelle

Tabelle. *Analogiebeziehungen*

Motorische Nervenendigungen	Elektrisches Analogmodell
Transmittersynthese	E_1
Speichervolumen C_{Sp}	C_2
Speicherinhalt $W(t)$	$C_2 \cdot U_2(t)$
Geschwindigkeitskonstanten k_2, k_1	g_2, g_1
Volumen des Reservoirs C_R	C_1
Inhalt des Reservoirs $V(t)$	$C_1 \cdot U_1(t)$
Konzentration (Ca_i)	$U_3(t)$
Konzentration $(Ca_i)_0$	E_3
Konzentration (Ca_e)	E_5
Konzentration (Ca_b)	$U_4(t)$
Volumina C_i, C_b	C_3, C_4
Geschwindigkeitskonstanten k_3, k_4, k_5	g_3, g_4, g_5
Freisetzung $Q = p \cdot V'$	$Q^{\vee} = p^{\vee} \cdot C_1 U_1'$
Freisetzungskoeffizient p	$p^{\vee} = p_0 \cdot \frac{U_3'}{E_3}$
Nachlieferung der Ach-Quanten	
in den Speicher (F_2)	$I_2 = g_2(E_1 - U_2)$
in das Reservoir (F_1)	$I_1 = g_1(U_2 - U_1)$
Ca-Fluß durch die Axonmembran in Ruhe (F_3)	$I_3 = g_3(E_3 - U_3)$
Ca-Fluß zwischen den Verteilungsräumen C_b und C_i (F_4)	$I_4 = g_4(U_4 - U_3)$
Zusätzlicher Ca-Einstrom während der Erregung (F_5)	$I_5 = g_5'(E_5 - U_3)$

2. Methodik

2.1. Theoretischer Teil: Das Modell

2.1.1. Grundlegende Hypothesen. Über die Vorgänge in den motorischen Nervenendigungen werden eine Reihe von Annahmen gemacht, die auf den experimentellen Ergebnissen verschiedener Autoren beruhen. Die einzelnen Hypothesen werden in den Abschnitten 3 und 4 diskutiert.

Es wurde angenommen (Abb. 1A):

1. Nur ein kleiner Teil des in der motorischen Nervenendigung vorhandenen Ach stehe unmittelbar für die Freisetzung zur Verfügung. Dieses Reservoir R habe ein Volumen[1] C_R und enthalte V Ach-Quanten. Ein AP bedinge in der motorischen Nervenendigung für die Dauer der Erregung t_e eine Erhöhung der Freisetzungswahrscheinlichkeit von Null (Spontanfreisetzung nicht berücksichtigt) auf einen konstanten Wert. Dadurch werde ein bestimmter Teil p — im folgenden als Freisetzungskoeffizient bezeichnet — der V' zu Beginn der Erregung im Reservoir R enthaltenen Quanten freigesetzt. Die Zahl der (pro AP) freigesetzten Quanten sei:

$$Q = p \cdot V'. \tag{1}$$

(Die Angabe Ach-Mengen in Quantenzahlen ist hier nur als Maßeinheit zu verstehen und besagt nicht, daß die Quanten vor der Freisetzung präformiert sein müssen. Die Natur der Nachlieferungsprozesse und die Form, in der das Acetylcholin vorliegt — in Lösung oder strukturgebunden — bleibt offen.)

2. Das freigesetzte Ach werde aus einem größeren Speicher Sp mit dem Volumen C_{Sp} und dem Inhalt W Quanten ergänzt. Dieser Ach-Fluß F_1 sei entsprechend der Grundgleichung für Fließgleichgewichte:

$$F_1 = k_1\left(\frac{W(t)}{C_{Sp}} - \frac{V(t)}{C_R}\right), \tag{2}$$

$$\frac{W_0}{C_{Sp}} = \frac{V_0}{C_R}. \tag{2a}$$

k_1 sei eine Konstante, V_0 und W_0 seien die Quantenzahlen in R bzw. Sp im Gleichgewicht, $V(t)$, $W(t)$ die Quantenzahlen zur Zeit t.

3. Der große Speicher werde durch Resynthese aufgefüllt. Dieser Ach-Fluß sei

$$F_2 = k_2 \frac{W_0 - W(t)}{C_{Sp}}. \tag{3}$$

4. Der Freisetzungskoeffizient p sei proportional zur Konzentration an Ca-Ionen[2] an der Membran-

[1] Mit Volumen ist hier und im folgenden nicht unbedingt der Rauminhalt eines bestimmten Kompartiments im Axoplasma gemeint. Volumen kann z.B. auch für eine bestimmte Zahl von aktiven Gruppen an der Membran stehen. Der Quotient aus Inhalt und Volumen sei gleich der treibenden Kraft entsprechend der Konzentration einer löslichen Substanz in einem Lösungsmittel.

[2] Es soll nichts darüber ausgesagt werden, ob das Calcium als 2wertiges Ion oder in einer anderen Form, etwa gebunden an eine negative geladen Gruppe Y^- als CaY^+ vorliegt.

innenseite (Ca_i) zu Beginn der Erregung (Abb. 1A).

$$p = k_p(Ca_i) \cdot \delta_e, \tag{4}$$

$$\delta_e = \begin{cases} 0 \text{ in Ruhe} \\ 1 \text{ während der Erregung.} \end{cases}$$

5. Der durch ein Aktionspotential hervorgerufene Ca-Einstrom F_5 sei proportional zum Ca-Gradienten über die Membran $(Ca_e) - (Ca_i)$. (Ca_e) = extracelluläre Ca-Konzentration

$$F_5 = k_5\big((Ca_e) - (Ca_i)\big). \tag{5}$$

6. Die durch den Ca-Einstrom hervorgerufene Erhöhung der Ca-Konzentration an der Membraninnenseite (Ca_i) bilde sich schnell wieder zurück, dadurch, daß sich das Ca im größeren Volumen der gesamten Nervenendigung verteilt (und/oder strukturgebunden wird). Die Konzentration in diesem größeren intracellulären Verteilungsraum sei (Ca_b), das Volumen C_b, das Volumen des kleinen membrannahen Raums C_i. Der Netto-Calciumfluß F_4 von einem Raum in den anderen sei:

$$F_4 = k_4\big((Ca_b) - (Ca_i)\big). \tag{6}$$

7. Schließlich werde ein aktiver Ca-Transport aus der Nervenendigung gefordert. Der Netto-Calciumfluß auswärts sei (wenn die Nervenendigung nicht erregt ist):

$$F_3 = k_3\big((Ca_i)_0 - (Ca_i)\big). \tag{7}$$

k_3, k_4 seien Konstanten, $(Ca_i)_0$ die Ca-Konzentration an der Membraninnenseite unter Gleichgewichtsbedingungen.

2.1.2. Das elektrische Analogmodell. Für das System der angeführten Hypothesen läßt sich ein elektrisches Analogmodell angeben (Abb. 1B, C). In dem Teilsystem der Abb. 1B entsprechen die elektrischen Ströme dem Ach-Fluß, in dem der Abb. 1C den Ca-Flüssen (Einzelheiten s. Tabelle). Insbesondere ist die teilweise Entladung des Kondensators C_1 über den Leitwert $g_0(U_3, t)$ während der Erregung der Ach-Freisetzung durch die Nervenendigung analog. Der entladende Stromstoß ist nach den Voraussetzungen in 2.1.1 rechteckförmig, die transportierte Ladung $Q^{\check{}}$ nach Gl. (1) und (4) proportional zu den Spannungen U_1' und U_3' an den Kondensatoren C_1 bzw. C_3 zu Beginn der Erregung. Der Leitwert g_0 ist deshalb während der Erregung nicht konstant. In Ruhe gilt $g_0(U_3, t) = 0$ (Spontanfreisetzung vernachlässigt s.o.).

Der Leitwert $g_5(t)$ entspricht der zusätzlichen Ca-Permeabilitätssteigerung durch die Erregung. In Ruhe gilt $g_5 = 0$, während der Erregung ist g_5 ein konstanter positiver Leitwert g_5'.

Das elektrische Analogmodell ist eine übersichtliche Darstellung der in Abschnitt 2.1.1 angeführten Hypothesen. Da es jedoch umständlich ist, mit einer der Abb. 1B, C entsprechenden Realschaltung zu experimentieren — ganz abgesehen von der Schwierigkeit, ein Schaltelement herzustellen, das die für $g_0(U_3, t)$ geforderten Eigenschaften besitzt — wurde das der Schaltung entsprechende System von Differentialgleichungen formuliert und auf einem Analogrechner programmiert (s. folgenden Abschnitt). Es wäre möglich gewesen, die Differentialgleichungen direkt aus den Hypothesen in Abschnitt 2.1.1 abzuleiten [Gl. (1)—(7)]. Das elektrische Analogschaltbild dient lediglich der Anschaulichkeit und erleichtert den Überblick über mehrere gleichzeitig ablaufende Vorgänge.

2.1.3. Formulierung der Differentialgleichungen. Aus den Schaltbildern der Abb. 1 lassen sich unter Verwendung der Kirchhoffschen Regeln folgende Differentialgleichungen ableiten:

$$\frac{dU_1}{dt} = \frac{1}{\tau_1}(U_2 - U_1) - \frac{g_0(U_3, t) \cdot U_1}{C_1}, \tag{8}$$

$$\frac{dU_2}{dt} = \frac{1}{\tau_2}(E_1 - U_2) + \frac{1}{\tau_1} \cdot \frac{C_1}{C_2}(U_1 - U_2), \tag{9}$$

$$\frac{dU_3}{dt} = \frac{1}{\tau_3}(E_3 - U_3) + \frac{1}{\tau_4}(U_4 - U_3) + \frac{g_5(t)}{C_3}(E_5 - U_3), \tag{10}$$

$$\frac{dU_4}{dt} = \frac{1}{\tau_4} \cdot \frac{C_3}{C_4}(U_3 - U_4), \tag{11}$$

wobei die Zeitkonstanten durch die Kapazitäten und Leitwerte definiert sind:

$$\tau_1 = \frac{C_1}{g_1}, \quad \tau_2 = \frac{C_2}{g_2}, \quad \tau_3 = \frac{C_3}{g_3}, \quad \tau_4 = \frac{C_3}{g_4}.$$

Für die der Acetylcholinfreisetzung analoge Ladungsmenge $Q^{\check{}}$, die während der „Erregungsdauer" t_e über $g_0(U_3, t)$ entladen wird, ist nach (1), (4) anzusetzen

$$Q^{\check{}} = g_0(U_3, t) \cdot U_1(t) \cdot t_e = p_0 \cdot \frac{U_3'}{E_3} \cdot C_1 U_1', \tag{12}$$

wobei U_3', U_1' gleich dem Wert von U_3 bzw. U_1 zu Beginn der Erregung sind und

$$k_p = \frac{p_0 \cdot C_1}{E_3}$$

gesetzt wird. Aus (8) und (12) erhält man

$$\frac{dU_1}{dt} = \frac{1}{\tau_1}(U_2 - U_1) - \frac{p^{\check{}}}{t_e} U_1' \cdot \delta_e \tag{8a}$$

mit

$$p^{\check{}} = p_0 \frac{U_3'}{E_3}. \tag{13}$$

$p^{\check{}}(t)$ ist der Anteil der Ladung $C_1 U_1'$ auf dem Kondensator C_1, der durch einen Reiz zur Zeit t entladen wird. $p^{\check{}}$ wird deshalb als Freisetzungskoeffizient bezeichnet. Ohne vorangehende Reizung ist $U_3' = E_3$ oder $p^{\check{}}(t) = p_0$; U_3'/E_3 bestimmt die relative Veränderung des Freisetzungskoeffizienten durch konditionierende Reizung.

Ähnlich wird mit $\tau_5 = C_3/g_5'$ aus (10)

$$\frac{dU_3}{dt} = \frac{1}{\tau_3}(E_3 - U_3) + \frac{1}{\tau_4}(U_4 - U_3) + \frac{\delta_e}{\tau_5}(E_5 - U_3). \tag{10a}$$

Damit sind die Hypothesen in Abschnitt 2.1.1 auf das System gekoppelter Differentialgleichungen (8a), (9), (10a), (11) zurückgeführt worden. Im folgenden wird zu untersuchen sein, ob sich die Meßergebnisse biologischer Experimente durch dieses System von Differentialgleichungen beschreiben lassen.

2.2. Experimenteller Teil

2.2.1. Experimente am biologischen Objekt. Zum Vergleich mit Modelluntersuchungen wurden experimentelle Ergebnisse anderer Autoren an verschiedenen

Nervmuskelpräparationen verwandt, und darüber hinaus wurden eigene Experimente am Zwerchfellphrenicuspräparat von Goldhamstern durchgeführt. Die Badflüssigkeit hatte die Zusammensetzung (mMol/l): NaCl, 118,5; $NaHCO_3$, 24,9; KH_2PO_4, 1,12; KCl, 4,74; $CaCl_2$, 2,54; $MgSO_4$, 1,12; Glucose, 5,0; Cholinchlorid, $4{,}8 \cdot 10^{-2}$. Die Lösung wurde mit 95% O_2 und 5% CO_2 durchperlt, der pH betrug 7,4; die Temperatur 30° C. Die neuromuskuläre Übertragung wurde meist durch d-Tubocurarin, $3-6 \cdot 10^{-6}$ g/ml, blockiert (im folgenden als „Curare-Block" bezeichnet). Einige Experimente wurden im „Magnesiumblock" durchgeführt:

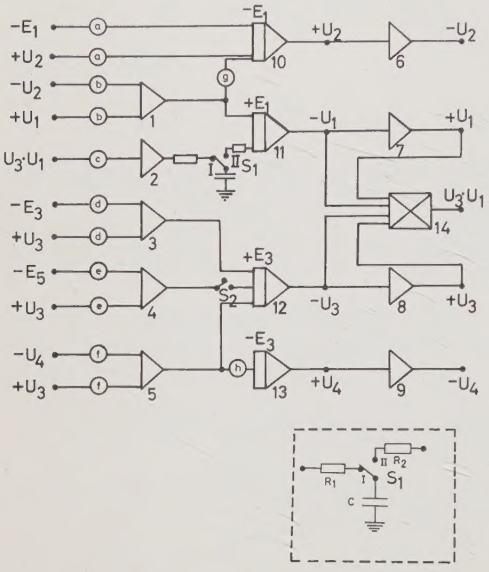

Abb. 2. Analogschaltbild der Differentialgleichungen (8a), (9), (10a), (11). Die Verstärker 1—9 bewirken Summation und Vorzeichenumkehr. Die Verstärker 10—13 sind als Integratoren geschaltet (Anfangsbedingungen $\pm E_1$, $\pm E_3$), das Schaltelement 14 ist ein Multiplikator. Die Potentiometer a bis h dienen zur Parametereinstellung. Im einzelnen bedeuten: $a = 1/\tau_2$, $b = 1/\tau_1$, $c = p_0(t_e \cdot E_3)$, $d = 1/\tau_3$, $e = 1/\tau_5$, $f = 1/\tau_4$, $g = C_1/C_2$, $h = C_3/C_4$. Die Schalterstellung von S_1 und S_2 in der Abbildung entspricht dem Zustand „Ruhe". Während der „Erregungsdauer" t_e sind S_1 und S_2 umgeschaltet (Stellung II). Für die Schaltelemente R_1, R_2, c (s. Ausschnitt) gilt $R_2 \cdot c \gg t_e \gg R_1 \cdot c$, d.h. die Spannung am Kondensator folgte in „Ruhe" nahezu verzögerungsfrei der Ausgangsspannung am Verstärker 2, wurde dagegen während der „Erregung" praktisch nicht vermindert

Hier wurde die Ca-Konzentration auf 1,1 mMol/l vermindert und die Mg-Konzentration auf 6—8 mMol/l erhöht.

Der N. phrenicus wurde mit supramaximalen Rechteckimpulsen von 0,15 msec Dauer gereizt.

Endplattenpotentiale wurden intracellulär mit der konventionellen Methode [29] abgeleitet. Die Glascapillaren waren mit 3 M Kaliumcitrat gefüllt und hatten Widerstände zwischen 10 und 30 MΩ. Die Endplattenpotentiale wurden auf einem Kathodenstrahloscillographen registriert und photographiert. In einem Versuch wurden die einem EPP entsprechende Quantenzahl aus der Streuung von 300 Endplattenpotentialamplituden berechnet [50].

2.2.2. Modelluntersuchungen. Die Differentialgleichungen (8a), (9), (10a), (11), wurden auf dem Analogrechner Pace TR 10 der Firma EAI programmiert. Abb. 2 zeigt das Analogschaltbild. Einzelheiten sind in der Legende erklärt. Auf die mögliche Einsparung einiger Verstärker wurde zugunsten einer größeren Übersichtlichkeit bei der Veränderung einzelner Parameter verzichtet.

Durch optimale Skalierung wurden die Rechenfehler gering gehalten. Sie sind in jedem Fall weitaus geringer als die in biologischen Experimenten zu erwartenden Abweichungen.

Der Gang eines Modellexperimentes war wie folgt:

Zunächst wurden an Potentiometern die Konstanten $a-h$ und E_1, E_3, E_5, festgelegt, die Relais S_1, S_2, standen auf „Ruhe", die Integratoren waren auf die Anfangsbedingungen $-E_1$, $+E_1$, $+E_3$, $-E_3$ eingestellt. Dann wurde auf Integration umgestellt. Bei richtiger Abgleichung der Konstanten blieben ohne „Reizung" U_1, U_2, U_3, U_4 über mehr als 10 min konstant. Durch Umschalten auf Erregung wurde am Punkt II des Schalters S_1 ein rechteckförmiger Spannungsverlauf bewirkt, dessen Amplitude mit dem konstanten Faktor $C_1 \cdot t_e$ multipliziert

$$Q^{\vee} = p_0 \cdot \frac{U_3'}{E_3} \cdot C_1 U_1'$$

betrug, d.h. an diesem Punkt konnte die „Freisetzung" im Modellversuch gemessen werden [vgl. Gl. (12)].

Nach einer konditionierenden Reizung zeigte die wiederum mit $C_1 \cdot t_e$ multiplizierte Spannung am Punkt I des Schalters S_1

$$Q^{+}(t) = p_0 \cdot \frac{U_3}{E_3} C_1 U_1 \tag{14}$$

kontinuierlich die Freisetzung an, die durch einen Testreiz zur Zeit t bewirkt worden wäre.

Die zeitliche Änderung des Freisetzungskoeffizienten

$$p^{+}(t) = p_0 \cdot \frac{U_3}{E_3} \tag{15}$$

und des Reservoirs an verfügbarem Überträgerstoff

$$V^{+}(t) = C_1 U_1 \tag{16}$$

wurden ebenfalls kontinuierlich gemessen.

Bei der Simulation eines biologischen Experimentes wurden zunächst $Q^{\vee}$ und/oder Q^{+} auf einem Kathodenstrahloscillographen registriert und mit biologischen Meßwerten (EPP) oder den ihnen entsprechenden Quantenzahlen verglichen. Die Parameter wurden solange verändert bis die bestmögliche Übereinstimmung erzielt war. Dann wurde die Stabilität des Systems bei den Anfangsbedingungen nochmals überprüft (s.o.) und schließlich das gesamte Reizprogramm des biologischen Versuchs bei einer festen Einstellung der Parameter am Modell wiederholt.

Bei den meisten Versuchen genügte ein Teil der experimentellen Daten zur Festlegung der Modellparameter; dann wurde geprüft, ob sich die übrigen Versuchsergebnisse des Tierexperiments voraussagen ließen.

Die Größenordnung der einzelnen Parameter lag bei $\tau_1 = 1$ sec; $\tau_2 = 30$ sec; $\tau_3 = 0{,}3$ sec; $\tau_4 = 0{,}05$ sec; $t_e = 1$ msec; $C_1/C_2 = 0{,}005$; $C_3/C_4 = 0{,}01$.

Weiterhin wurde $t_e \ll \tau_5$ und $E_5 \gg U_3$ festgesetzt. Damit wird die Zunahme von p nach der Erregung

$$p^{+}(t + t_e) - p^{+}(t) = p_0 \cdot \frac{t_e}{\tau_5} \cdot \frac{E_5}{E_3}$$

die relative Zunahme nach dem ersten Reiz

$$\Delta p = \frac{p^+(t_e) - p_0}{p_0} = \frac{t_e \cdot E_5}{\tau_5 \cdot E_3} . \qquad (17)$$

Δp betrug im Mittel ungefähr 0,3. p_0 lag, je nach den Versuchsbedingungen, zwischen 0,001 und 0,3. Nach dem Reiz nimmt Δp nahezu exponentiell ab mit der Zeitkonstanten

$$\tau^* = \frac{\tau_3 \cdot \tau_4}{\tau_3 + \tau_4} . \qquad (18)$$

Die Zahl der einzelnen Parameter, die bei verschiedenen Experimenten variiert wurden, betrug demnach acht: $\tau_1, \tau_2, \tau_3, \tau_4$, C_1/C_2, C_3/C_4, p_0, Δp. Durch Δp wurden [Gl. (17)] mehrere Parameter zusammengefaßt.

3. Ergebnisse

Bei der Untersuchung der durch konditionierende Reizung bewirkten Änderung der Ach-Freisetzung werden in biologischen Experimenten bestimmte Reizmuster besonders häufig verwandt:

1. Tetanische Reizung mit unterschiedlicher Reizzahl und Reizfrequenz zur Ermittlung der Ach-Freisetzung im Verlauf des Tetanus.

2. Reizung durch Einzelreize oder Reizserien und Testreizung nach einem veränderlichen Intervall.

Die relativ geringe Überlebensdauer des biologischen Präparats und die infolge der Quantelung des Freisetzungsprozesses erhebliche Streuung der Meßergebnisse hatten zur Folge, daß für quantitative Untersuchungen bisher an einer Endplatte immer nur ein kleiner Teil eines umfassenden Reizprogramms abgeleitet werden konnte. Es kommt hinzu, daß der Einfluß einer konditionierenden Reizung im Curare-Block und im Magnesium-Block weitgehend verschieden ist, in einem Experiment jedoch in der Regel nur eine Form des neuromuskulären Blocks verwandt wurde. Die Kenntnis von der Wirkung einer konditionierenden Reizung auf die Transmitterfreisetzung stützt sich daher auf eine Vielzahl von Untersuchungen an verschiedenen Nerv-Muskel-Präparationen. Zwar werden unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen ähnliche Resultate erzielt (s.u. Abschnitt 3.2), doch finden sich deutliche quantitative Unterschiede schon bei verschiedenen Endplatten desselben Präparats (s. z.B. Referenz [22]). Noch stärkere Abweichungen wurden naturgemäß beim Vergleich von Experimenten beobachtet, die an Nerv-Muskel-Präparationen verschiedener Species, in unterschiedlichen Blutersatzlösungen und bei verschiedener Temperatur vorgenommen wurden.

Hieraus ergeben sich für Modelluntersuchungen zwei unterschiedliche Fragestellungen:

1. Können durch das Modell die Änderungen der Ach-Freisetzung während und nach frequenter Reizung von unterschiedlicher Dauer und Frequenz bei *einer festen* Einstellung der Parameter qualitativ reproduziert werden? Insbesondere: Lassen sich durch Verminderung des Freisetzungskoeffizienten p_0 (etwa um den Faktor 100) im Modellversuch Änderungen hervorrufen, wie sie im biologischen Experiment beobachtet werden, wenn anstatt im Curare-Block im Magnesium-Block abgeleitet wird?

2. Können einzelne Experimente, in denen jeweils verschiedene Reizmuster im Curare- oder Magnesium-Block appliziert wurden, in Modellversuchen quantitativ simuliert werden?

(Hier muß für jedes Experiment die optimale Parametereinstellung gefunden werden.)

3.1. Untersuchung der Modelleigenschaften mittels unterschiedlicher Reizmuster

In dem Modellexperiment, das der Abb. 3 zugrunde liegt, wurden alle Parameter bis auf p_0 konstant gehalten (Einzelheiten s. Legende). p_0 betrug 0,0028 in

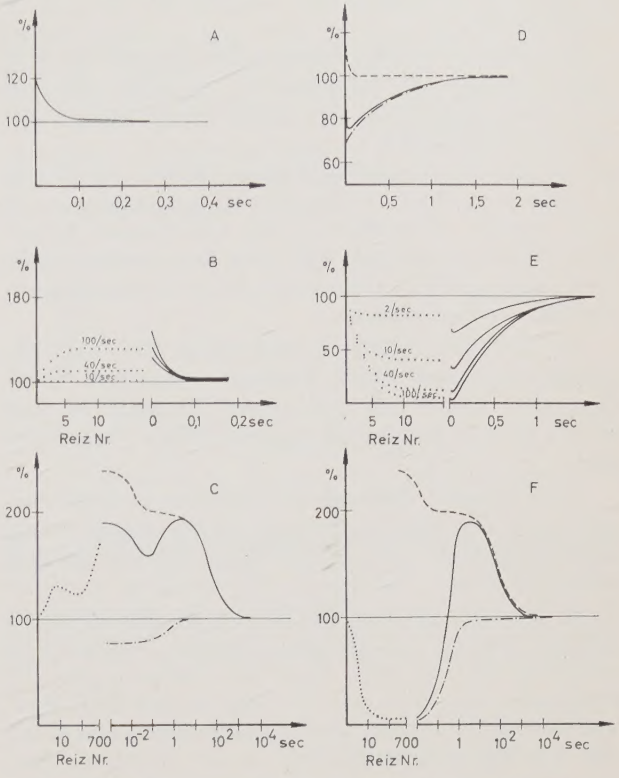

Abb. 3. Änderung der „Transmitterfreisetzung" während und nach frequenter Reizung im Modellversuch. ····· $Q_n^{\vee}$ Freisetzung durch den n-ten Reiz einer Serie in Prozent der Freisetzung durch den ersten Reiz Q_1. ——— Q^+ Freisetzung, die ein Testreiz nach einer konditionierenden Reizung bewirken würde, in Prozent von Q_1^+. ------ p^+ Freisetzungskoeffizient für einen Testreiz, in Prozent von p_0. —·—·— V^+ Menge an unmittelbar freisetzbarem Überträgerstoff in Prozent von V_0. Es gilt (s. S. 114) $Q^+(t) = p^+(t) \cdot V^+(t)$. Parametereinstellung $p_0 = 0{,}0028$ in A, B, C; $p_0 = 0{,}28$ in D, E, F. Die übrigen Parameter wurden nicht verändert und betrugen: $\tau_1 = 0{,}5$ sec; $\tau_2 = 16{,}5$ sec; $\tau_3 = 1{,}25$ sec; $\tau_4 = 0{,}033$ sec; $C_3/C_4 = 0{,}0135$; $C_1/C_2 = 0{,}004$; $\Delta p = 0{,}18$. Konditionierende Reizung: A, D: 1 Reiz. B: 16 Reize mit 10/sec, 40/sec, 100/sec. E: 17 Reize mit 2/sec, 10/sec, 40/sec, 100/sec. C, F: 700 Reize mit 100/sec

A, B, C bzw. 0,28 in D, E, F, d.h. im letzteren Fall (D, E, F) wurden durch einen Einzelreiz 28% des Reservoirs an verfügbarem Transmitter freigesetzt, im ersteren Fall (A, B, C) 0,28% — etwa entsprechend einem biologischen Experiment im Curare- bzw. im Magnesium-Block.

Registriert wurden die Freisetzung durch einen Reiz $Q^{\vee}$ [s. Gl. (12)], sowie nach einer konditionierenden Reizung die Größen $Q^+(t)$, $p^+(t)$ und $V^+(t)$ [Gln.(14), (15) und (16)]. $Q^+(t)$ ist die Freisetzung, die ein Testreiz zur Zeit t nach der konditionierenden Reizung bewirken würde, und ist gleich dem Produkt aus der Menge an verfügbarem Überträgerstoff $V^+(t)$ und dem Freisetzungskoeffizienten $p^+(t)$.

Die in diesem Modellversuch gefundenen Veränderungen der Transmitterfreisetzung während und nach frequenter Reizung stimmen mit den Ergebnissen entsprechender biologischer Experimente qualitativ überein, wie unten im Abschnitt 3.2 im einzelnen belegt und ausgeführt wird. Die Abb. 3 ermöglicht daher einen Überblick über eine Reihe von Phänomenen, die weiter unten im Detail untersucht werden:

A. Im Mg-Block ist nach einem konditionierenden Reiz die Ach-Freisetzung durch einen Testreiz erhöht. Diese Bahnung klingt schnell exponentiell auf den Ausgangswert ab.

B. Kurze tetanische Reizung mit Frequenzen über 10/sec bewirkt eine zunehmende Bahnung, die sich nach Ende der Reizung mit ähnlichem Zeitverlauf wie unter A zurückbildet.

C. Längere tetanische Reizung führt — in diesem Versuch nach einer vorübergehenden Abnahme — zu einer weiteren Vergrößerung der Ach-Freisetzung pro Reiz. Nach der Reizung läßt sich eine posttetanische Potenzierung (PTP) nachweisen, in der 2 Phasen unterschieden werden können.

D. Im Curare-Block ist nach einem Reiz die Ach-Freisetzung durch einen Testreiz vermindert. Diese Depression bildet sich nach einem Minimum bei 0,05 bis 0,1 sec mit annähernd exponentiellem Verlauf zurück.

E. Frequente Reizung bewirkt eine zunächst zunehmende Depression, die nach einigen Reizen in ein Plateau ausläuft. Die Rückbildung verläuft ähnlich wie unter D.

F. Ein Tetanus von 700 Reizen mit der Frequenz 100/sec bewirkt — in diesem Versuch — keine Veränderung des Plateaus. Nach dem Tetanus geht die Depression innerhalb von 1—2 sec in eine PTP über, die einen ähnlichen Verlauf wie die zweite Phase der PTP im Mg-Block hat.

Die Bedeutung der einzelnen Modellparameter für die Ergebnisse der verschiedenen Teilversuche der Abb. 3 sei an Hand des elektrischen Analogschaltbildes (Abb. 1) erläutert (Analogiebeziehungen s.o. Tabelle):

Im „Mg-Block" ($p_0 = 0{,}0028$) ist die Verminderung des unmittelbar verfügbaren Ach bzw. der Spannung U_1 durch einen Reiz oder durch einen kurzen Tetanus vernachlässigbar. Änderungen in der Freisetzung pro Reiz sind daher auf Änderungen des Freisetzungskoeffizienten bzw. der Spannung U_3 zu beziehen.

A. Während der Erregung durch den konditionierenden Reiz ist $g_5(t)$ von Null verschieden. Dadurch wird die Spannung U_3 um $\Delta p \cdot E_3$ erhöht [Gl. (17)]. Nach der Erregung wird der Kondensator C_3 über g_4 auf den viel größeren Kondensator C_4 und durch E_3 über g_3 auf den Ausgangswert E_3 entladen. Die maximale Bahnung wird durch den Parameter Δp festgelegt, die Zeitkonstante τ^* der nahezu exponentiell verlaufenden Rückbildung der Bahnung [Gl. (18)] durch die Parameter τ_3 und τ_4. Durch ein entsprechendes biologisches Experiment läßt sich demnach Δp ermitteln, τ_3 und τ_4 jedoch nicht eindeutig festlegen. Die übrigen Parameter haben keinen Einfluß auf den Kurvenverlauf, solange $p_0 \ll 1$ und $C_3 \ll C_4$.

B. In diesem Versuch ist $C_3/C_4 = 0{,}0135$, d.h. während einer kurzen Reizserie wird die Spannung am Kondensator C_4 durch die von C_3 abfließende Ladung nur geringfügig erhöht. Wenn zur Zeit des 2. Reizes die Spannungserhöhung an C_3 noch nicht abgeklungen ist, kommt es im Verlauf der Reizserie zu einer zunehmenden Bahnung, weil sich durch jeden Reiz U_3 um $\Delta p \cdot E_3$ erhöht. Da auch der Entladungsstrom (proportional zu $U_3 - E_3$) zunimmt, stellt sich nach einigen Reizen ein Gleichgewicht zwischen der Aufladung während der „Erregung" und der Entladung im Reizintervall ein: Die Freisetzung pro Reiz erreicht ein Plateau. Nach Ende der Reizung klingt die Bahnung wie nach einem Einzelreiz mit der Zeitkonstanten τ^* ab.

In diesem Versuch ist auch die Bahnung durch kurze Tetani im wesentlichen nur von Δp und τ^* abhängig. In anderen Versuchen kann der Verlauf der Bahnung jedoch modifiziert sein: Bei etwas höheren Werten von p_0 und C_3/C_4 treten schon bei kürzeren Reizserien Veränderungen auf, wie sie bei diesem Versuch erst im Verlauf der längeren Serie mit 100/sec zu beobachten sind.

C. Die Freisetzung während dieser Reizserie von 700 Reizen führt zu einer Abnahme der Spannung U_1 bis auf 78% vom Ausgangswert und damit zu einer vorübergehenden Verminderung der Bahnung. Andererseits nimmt durch die Erhöhung von U_3 auch die Spannung U_4 am Kondensator C_4 langsam zu. Dadurch wird der Kondensator C_3 im Reizintervall weniger entladen, so daß auch U_3 und damit die Bahnung ständig weiter ansteigt. Am Ende der Reizung beträgt U_3 das 2,35fache des Ausgangswertes. (Dieses posttetanische Maximum nimmt zu bei einer Vergrößerung der Parameter Δp, τ_3, C_3/C_4 oder bei einer Verringerung von τ_4.)

Nach der Reizung fällt U_3 (gestrichelte Kurve) zunächst schnell auf einen Wert zwischen U_4 und E_3 ab. Diese Phase entspricht der Rückbildung der Bahnung nach wenigen Reizen. Danach folgt die weitere Abnahme von U_3 dem zeitlichen Verlauf der Entladung des Kondensators C_4 über g_4 und g_3; d.h. sie verläuft nahezu exponentiell mit einer Zeitkonstanten

$$\tau^+ = C_4/C_3 \cdot (\tau_3 + \tau_4).$$

Der Kondensator C_1 wird nach Ende der Reizung mit der Zeitkonstanten τ_1 wieder aufgeladen (strichpunktierte Kurve). Da die Freisetzung (ausgezogene Kurve) proportional dem Produkt von U_1 und U_3 ist, kommt es zu einer, auch in biologischen Experimenten (Abb. 13) beobachteten, zweiphasischen PTP.

D. Im Curare-Block ($p_0 = 0{,}28$) werden durch einen Reiz 28% der Ladung von C_1 freigesetzt. Die Wiederaufladung erfolgt über g_1 von dem viel größeren Kondensator C_2 mit der Zeitkonstanten τ_1 (strichpunktierte Kurve). Die Veränderungen von U_3 sind die gleichen wie im Mg-Block. Die dort schon beschriebene Erhöhung von U_3 nach einem Reiz (gestrichelte Kurve) hat zur Folge, daß die Depression der Freisetzung (ausgezogene Kurve) erst nach etwa 0,05 sec maximal wird.

E. Wenn der Reizabstand bei tetanischer Reizung kleiner als ungefähr $2\tau_1$ ist, kommt es zu einer zunehmenden Verminderung von U_1. Dadurch nimmt auch der Aufladungsstrom (proportional zu $U_2 - U_1$) zu, so daß sich nach einigen Reizen ein Plateau ausbildet. Wenn U_1 auf wenige Prozent des Ausgangswertes abgefallen ist, ist der Aufladungsstrom im Intervall nahezu maximal. In diesem Bereich ist die Frei-

setzung pro AP im wesentlichen eine Funktion des Reizintervalls. Das heißt im Bereich des Plateaus ist die bei höheren Frequenzen beschriebene (s.o. B) Zunahme des Freisetzungskoeffizienten nur von geringem Einfluß auf die Freisetzung.

Die Rückbildung der Depression nach kurzen Reizserien entspricht der Rückbildung nach einem Einzelreiz.

F. Während der längeren Reizserie (700 Reize, 100/sec) nimmt die Spannung U_2 nur um wenige Prozent ab ($C_1/C_2 = 0{,}004$), so daß das nach einigen Reizen erreichte Plateau konstant bleibt (s. dagegen Abb. 14). Nach der Reizung wird wie nach kurzen Reizserien der Kondensator C_1 innerhalb weniger Sekunden wieder aufgeladen. Da die posttetanischen Veränderungen von U_3 denen im Mg-Block gleich sind, geht die tetanische Depression in eine PTP über.

In diesem Experiment war die genaue Festlegung der Parameter τ_2 und C_1/C_2 nicht kritisch im Hinblick auf die Versuchsergebnisse. Sie wird es dann, wenn in einem Experiment im Curare-Block im Verlauf einer längeren Reizung das zunächst erreichte Plateau der Freisetzung pro Reiz langsam weiter abnimmt (Abb. 14). In derartigen Experimenten ist in der posttetanischen Phase die Wiederaufladung des Kondensators C_1 verlangsamt, in Übereinstimmung mit biologischen Experimenten, in denen beobachtet wurde, daß bei gleicher Frequenz eine Erhöhung der Reizzahl neben einer Verstärkung ein verzögertes Einsetzen der PTP bewirkt [47].

3.2. Anwendung des Modells auf biologische Experimente

3.2.1. Doppelreize. Im starken Mg-Block wird bei mittleren Quantenzahlen unter 2 häufig kein Ach-Quantum durch ein AP freigesetzt. Unter diesen Bedingungen ist die Antwort auf einen Testreiz unabhängig davon, ob durch den konditionierenden Reiz eine Ach-Freisetzung erfolgte [29]. Dagegen ist in einer dem Blut ungefähr isoionalen Ersatzlösung (Curare-Block) bei mittleren Quantenzahlen um 200 das Test-EPP bei gleichem Reizintervall um so größer, je niedriger das erste EPP war [22].

Daraus folgt, daß sich nur bei initial niedriger Ach-Freisetzung die Ach-Entleerung durch die Freisetzung vernachlässigen läßt.

Bei der Untersuchung des Reizerfolges von Doppelreizen im Mg-Block liegt gleichsam der einfachste Fall einer konditionierenden Reizung vor. Abb. 4 zeigt einen solchen Versuch von Hubbard mit experimentellen Daten von intracellulären Ableitungen am Rattenzwerchfell [29]. Die Meßpunkte sind Mittelwerte von je 10—15 Messungen des Amplitudenverhältnisses Test-EPP : konditionierendes EPP. Die ausgezogene Kurve wurde nach einem Einzelreiz am Modell als der Quotient $Q^+(t)/Q_1^{\check{}}$ abgeleitet. $Q_1^{\check{}}$ entspricht nach [12] der Ach-Menge, die durch den ersten Reiz freigesetzt wird, $Q^+(t)$ nach [14] der Ach-Menge, die ein zweiter Reiz zur Zeit t freisetzen würde. Da die Freisetzung gering angesetzt wurde ($p_0 = 0{,}005$), gibt die Kurve praktisch den Zeitverlauf von $p^+(t)/p_0$ wieder: Die Freisetzungswahrscheinlichkeit ist nach einem Reiz erhöht und fällt exponentiell auf den Ausgangswert ab (vgl. Abb. 3A). Bei der Parametereinstellung am Modell sind neben den Voraussetzungen $p_0 \ll 1$ und $C_3 \ll C_4$ nur die Zeitkonstante $\tau^* = 37$ msec — s. Formel (18) — und die Zunahme des Freisetzungskoeffizienten um 38% ($\Delta p = 0{,}38$) für den Kurvenverlauf von Bedeutung.

Entgegen unserer Deutung ist Hubbard [29] der Auffassung, daß eine verstärkte „Mobilisation" von Ach in die freisetzbare Position Ursache der Bahnung sei. Versuche mit Doppelreizen im Curare-Block bei hoher initialer Ach-Freisetzung stützen unsere Auffassung. Schon 1941 haben Eccles, Katz und Kuffler [21] mit extracellulären Ableitungen vom Gesamtmuskel zeigen können, daß sich nach einem konditionierenden Reiz für kurze Intervalle meist eine Bahnung, für längere aber immer eine Depression des zweiten EPPs nachweisen läßt. Abb. 5A zeigt einen solchen Versuch mit intracellulärer Ableitung von EPPs am Goldhamsterzwerchfell. Aus weiteren an der gleichen Faser abgeleiteten EPPs wurde die einem Einzelquant entsprechende Depolarisationshöhe und daraus die mittlere Amplitude des konditionierenden EPPs mit 183 Quanten berechnet.

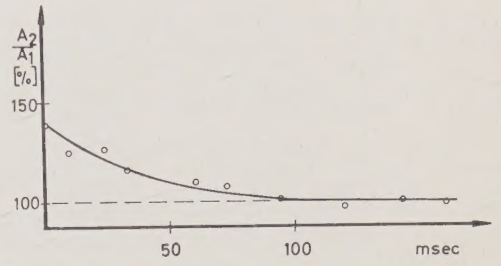

Abb. 4. Doppelreiz im Mg-Block. Meßpunkte nach einem Versuch von Hubbard ([29], Abb. 1C), mit intracellulärer Ableitung am Rattenzwerchfell, Temperatur ca. 36° C. Jeder Meßpunkt entspricht dem Mittelwert des Amplitudenverhältnisses des 2. und 1. EPP von je 10—15 Doppelreizen. Die ausgezogene Kurve wurde am Modell als der Quotient $Q^+(t)/Q_1^{\check{}}$ abgeleitet

Die experimentellen Werte werden im Modellversuch wiederum durch den Quotienten $Q^+(t)/Q_1^{\check{}}$ approximiert. Der Kurvenverlauf ergibt sich durch das unterschiedliche Verhalten von $V^+(t)/V_0$ und $p^+(t)/p_0$ nach dem konditionierenden Reiz (Abb. 5B, vgl. Abb. 3D). Danach wird die Depression durch Entladung des Reservoirs an unmittelbar verfügbaren Ach auf 68% ($p_0 = 0{,}32$) hervorgerufen, das mit der Zeitkonstanten $\tau_1 = 0{,}31$ sec auf den Ausgangswert aufgefüllt wird. Das Reservoir R enthält demnach ca. 570 Quanten in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von Elmquist und Quastel [22] bzw. Thies [62].

Thies konnte darüber hinaus wahrscheinlich machen, daß Veränderungen der Ca- und Mg-Konzentration sich entsprechend der Zahl der freigesetzten Quanten stark auf das Ausmaß der Depression, jedoch nicht merklich auf die initiale Vergrößerung des Freisetzungskoeffizienten und die Zeitkonstante der Wiederaufladung auswirken [62]. Wenn man diese Bahnung nach einem AP durch „Mobilisierung" von Ach erklären will, so ist es schwer zu verstehen, warum die durch die Freisetzung bedingte Depression erst verzögert einsetzt.

3.2.2. Kurze Tetani. Die nach Einzelreizen beschriebene Bahnung oder Hemmung eines Test-EPPs läßt sich bei kurzer (10—40 Reize) tetanischer Reizung noch eindrucksvoller demonstrieren. Bei Mg-blockierten Präparaten mit niedriger anfänglicher Ach-Freisetzung (etwa 1—10 Quanten/AP) kommt es bei der Reizung

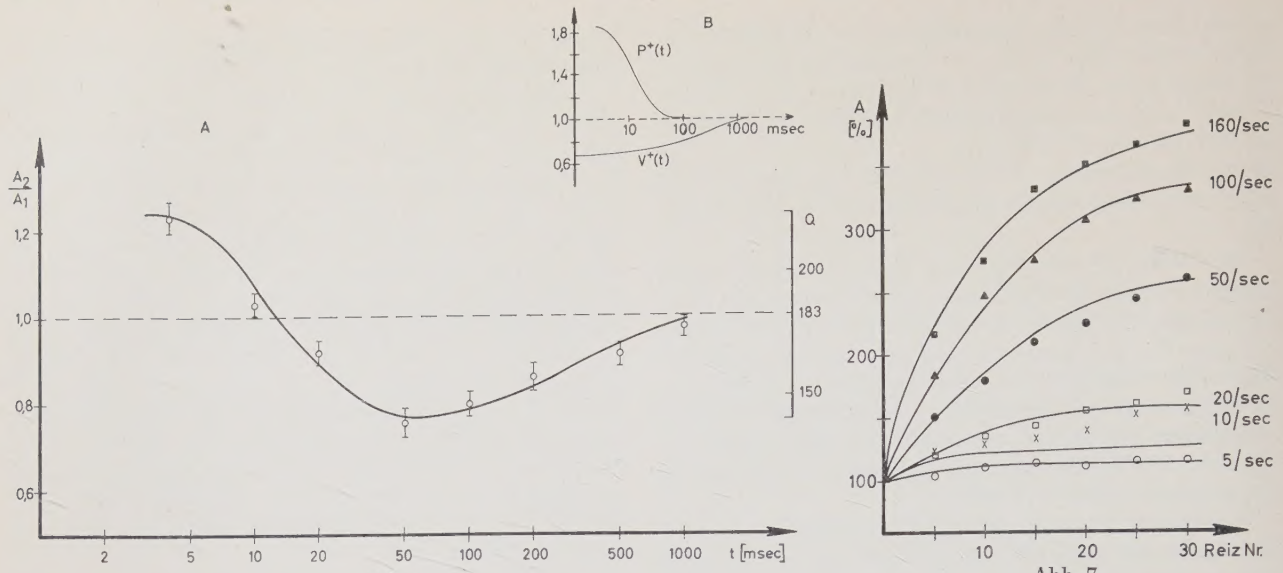

Abb. 5

Abb. 7

Abb. 5. Doppelreiz im Curare-Block. A Intracelluläre Ableitung am Goldhamsterzwerchfell, Temperatur 30° C. Die Meßpunkte stellen den Mittelwert (und σ_M) des EPP-Amplitudenverhältnisses von je 10 Doppelreizen dar. Die durch den konditionierenden Reiz freigesetzte mittlere Quantenzahl wurde aus der Streuung von 300 Einzel-EPP berechnet [51], deren mittlere Amplitude 0,66 mV betrug. Die ausgezogene Kurve wurde im Modellversuch als der Quotient $Q^+(t)/Q_1^\vee$ nach dem Reiz abgeleitet. B Zugleich wurden $p^+(t)$ und $V^+(t)$ registriert und jeweils als Vielfaches des Ausgangswertes p_0 bzw. V_0 aufgetragen

Abb. 7. Bahnung im Verlauf kurzer tetanischer Reizung im Mg-Block. Experimentelle Daten von BRAUN, SCHMIDT und ZIMMERMANN ([8], Abb. 2), intracelluläre Ableitungen am Froschsartorius, Temperatur ca. 24° C. Bei jeder Frequenz wurden je 10 Tetani von 32 Impulsen appliziert. Je 5 (von 3—32) aufeinanderfolgende EPP-Amplituden wurden zusammengefaßt und dann dieser Mittelwert in Prozent des Mittelwerts der ersten beiden Potentiale über der Reizzahl aufgetragen. Im Modellversuch wurde bei entsprechender Reizung $Q_n^\vee/Q_1^\vee$ registriert und die Amplituden durch eine Kurve verbunden

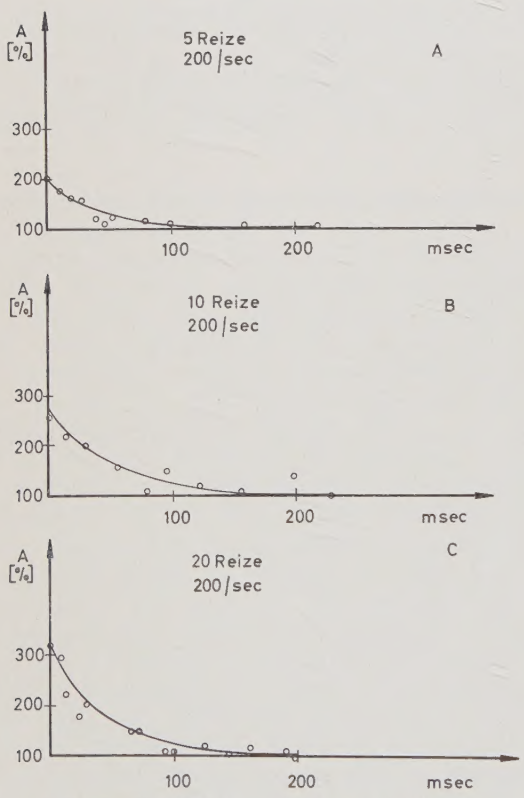

Abb. 6. Bahnung der EPP-Amplituden nach kurzer tetanischer Reizung. Experimentelle Daten von HUBBARD ([29], Abb. 4), intracelluläre Ableitungen am Rattenzwerchfell, Temperatur ca. 36° C. Jeder Meßpunkt stellt die mittlere EPP-Amplitude dar, die nach 10—15 konditionierenden Reizungen für jedes Intervall gemessen wurde, aufgetragen in Prozent der mittleren EPP-Amplitude von Einzelreizen. Die Zahl der Reize betrug 5 (A), 10 (B), 20 (C), die Reizfrequenz 200/sec. Die ausgezogene Kurve wurde im Modellversuch registriert als $Q^+(t)/Q_1^\vee$ nach entsprechender Reizung

mit Frequenzen über 5—10/sec zu einer ständig zunehmenden Vergrößerung der Quantenzahlen [8, 15, 29, 45, 49]. Im Unterschied dazu führt Reizung mit Frequenzen über etwa 0,3/sec in einer ungefähr blutisoionalen Ersatzlösung (Curare-Block) zu einer zunehmenden Depression der EPP-Amplituden im Verlauf der Reizserie, und zwar auch dann, wenn bei Frequenzen über etwa 30/sec das zweite Potential noch gebahnt ist [11, 15, 22, 28, 45, 47, 48, 54, 60]. Dies unterstützt die Auffassung, daß die Bahnung durch eine Vergrößerung des Freisetzungskoeffizienten p, die Depression durch Verminderung des verfügbaren Ach bewirkt werden.

Die Meßpunkte in der Abb. 6 sind einem Versuch von HUBBARD [29] am Rattenzwerchfell entnommen, in dem der Verlauf der Bahnung nach 5, 10 und 20 Reizen bei einer Reizfrequenz von 200/sec untersucht wurde (Mg-Block, Einzelheiten s. Legende). Für die Simulierung am Modell waren 2 Konstanten kritisch: $\tau^* = 47$ msec und $\Delta p = 0{,}31$ wurden für die optimale Anpassung des Verlaufs von $Q^+(t)/Q_1^\vee$ an die Meßwerte nach dem Tetanus von 10 Reizen gefunden. Damit ließ sich sowohl das Ausmaß wie auch der Verlauf der Bahnung nach 5 bzw. 20 Reizen recht genau „voraussagen".

Die Zunahme der Bahnung im Verlauf von kurzen Reizserien im Mg-Block wurde von BRAUN, SCHMIDT und ZIMMERMANN [8] in ausgedehnten Untersuchungen am Froschmuskel gemessen. Der Abb. 7 liegen Daten eines in dieser Arbeit angegebenen Experiments zugrunde. Es wurden Tetani von 32 Reizen bei Reizfrequenzen von 5/sec bis 160/sec registriert. Beim Modellversuch wurde $Q_n^\vee/Q_1^\vee$, der Quotient aus der Freisetzung durch den n-ten und den ersten Reiz gemessen. Die Parametereinstellung wurde gesucht, die bei den Frequenzen 5/sec und 160/sec die beste Übereinstimmung

mit den Daten des Tierversuchs ergab und dann bei der gleichen Einstellung die übrigen Reizserien registriert. Die Meßpunkte wurden zur besseren Unterscheidung von den biologischen Meßwerten durch eine Kurve verbunden. Die Abb. 7 zeigt eine gute Übereinstimmung sowohl im Ausmaß wie im Verlauf der Bahnung nicht nur bei Reizung mit 5/sec und 160/sec, sondern auch für die übrigen Frequenzen, mit Ausnahme von 10/sec; doch dürfte diese Abweichung im Bereich der biologischen Schwankungen liegen. (Berechnung des Kontrollwertes aus nur 20 EPP-Amplituden.)

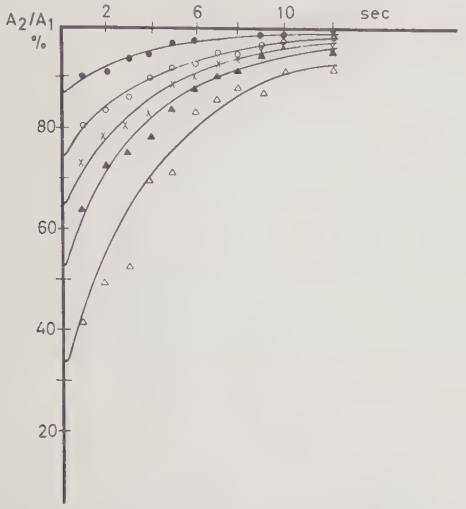

Abb. 8. Depression der EPP-Amplituden nach kurzen Reizserien im Curare-Block. Meßpunkte nach einem Versuch von Takeuchi ([60], Abb. 10), extracelluläre Massenableitungen am Froschsartorius, Temperatur 24° C. Reizzahl und zugehörige Symbole: 1 (○), 2 (●), 3 (×), 5 (▲), 8 (△), Reizfrequenz 50/sec. EPPs in Prozent des ersten konditionierenden EPP. Im Modellversuch wurden die ausgezogenen Kurven nach entsprechender Reizung als der Quotient $Q^+(t)/Q_1^\vee$ registriert

Einer der wichtigsten experimentellen Befunde, der dazu führte, eine kleine Menge an verfügbarem Ach und einen größeren Ach-Speicher anzunehmen, war die nahezu exponentiell verlaufende Rückbildung der Depression nach einem Einzelreiz, die von mehreren Autoren beschrieben wurde [47, 48, 60, 62]. Von Takeuchi [60] wurde darüber hinaus der Verlauf der Depression nach kurzen Tetani von 8, 5, 3 und 2 Reizen bei einer Frequenz von 50/sec mittels extracellulärer Ableitung am Froschsartorius untersucht und darauf hingewiesen, daß die Rückbildung der Depression exponentiell verläuft mit praktisch unveränderlicher Zeitkonstanten. Dieser Versuch läßt sich mit dem Modell besonders gut reproduzieren (Abb. 8). Zur Simulation des Verlaufs der Depression nach einem Reiz wurden die Zeitkonstanten $\tau_1 = 4{,}6$ sec und der Freisetzungskoeffizient $p_0 = 0{,}15$ festgelegt. Für eine sich überlagernde Bahnung ist kein Hinweis vorhanden; allerdings kann sie im Verlauf der ersten Sekunde abgeklungen sein (erster Testreiz nach 1 sec). Sie wurde mit $\Delta p = 0{,}02$ und $\tau^* = 120$ msec als gering angenommen. Mit dieser Einstellung ließen sich das Ausmaß und der Verlauf der Depression nach 2, 3, 5 und 8 Reizen sehr genau voraussagen.

Zwei ähnliche Versuche am Warmblüter mit etwas längeren konditionierenden Tetani (10—50 Reize) finden sich in der schon zitierten Arbeit von Hubbard ([29], Abb. 8 und 9). Wir haben bisher nicht versucht, diese Ergebnisse quantitativ zu simulieren, doch ist es wahrscheinlich, daß die erste, schnelle Phase der Rückbildung der Depression im Bereich von 0—100 msec von dem Modell nicht nachgeahmt werden kann. Wir kommen auf diesen Punkt zurück.

Im Verlauf einer tetanischen Reizung im Curare-Block kommt es zuerst zu der beschriebenen schnell zunehmenden Depression der EPPs. Nach 3—10 Reizen bildet sich dann ein Plateau mit nahezu konstanten EPP-Amplituden aus, das nur sehr langsam weiter abfällt. Die Höhe des Plateaus nimmt mit zunehmender

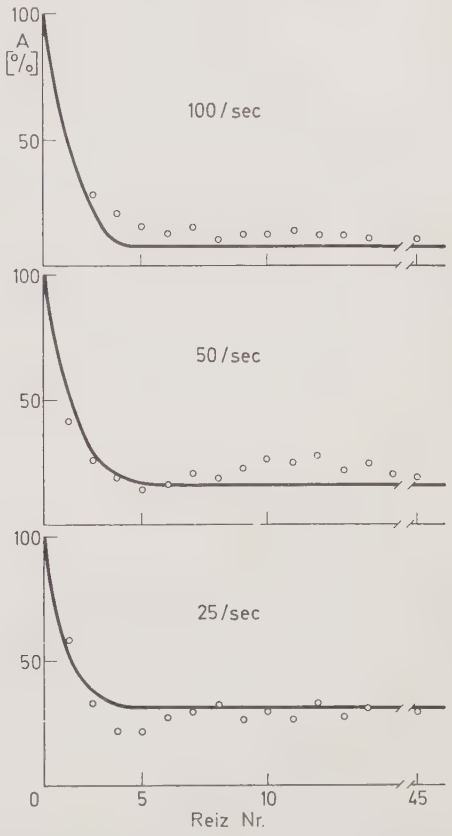

Abb. 9. Depression der EPP-Amplituden im Verlauf kurzer tetanischer Reizung im Curare-Block. Intracelluläre Ableitung am Goldhamsterzwerchfell, Temperatur 30° C. Bei jeder der Frequenzen 100/sec, 50/sec und 25/sec wurden 4 Reizserien von 45 Reizen appliziert, die EPP-Amplituden gemittelt und in Prozent der mittleren Amplitude des ersten EPPs über der Reizzahl aufgetragen. Im Modellversuch wurde bei denselben Frequenzen $Q_n^\vee/Q_1^\vee$ registriert und die Meßpunkte durch eine Kurve verbunden

Reizfrequenz ab [22, 29]. Das veranschaulicht ein Versuch am Goldhamsterzwerchfell, in dem bei den Frequenzen 25/sec, 50/sec und 100/sec EPP-Serien von 45 Reizen registriert wurden (Abb. 9). Die Meßpunkte sind Mittelwerte der EPP-Amplituden von je 4 Reizserien. Bei dem entsprechenden Modellexperiment sollte erreicht werden, sowohl den initialen Abfall der EPPs als auch die Amplitude im Bereich des Plateaus quantitativ zu simulieren. Die Meßpunkte bei der Frequenz 25/sec wurden zur Einstellung der Parameter verwandt. Die Zeitkonstante $\tau_1 = 0{,}15$ sec war im Vergleich zu den Versuchen mit Doppelreizen erstaunlich niedrig. Bei der Kontrolle mit 50/sec und 100/sec erwies sich, daß im Bereich des Plateaus die biologischen Werte durchweg etwas höher lagen als die am Modell registrierten Kurven.

In diesem Bereich ist die Freisetzung pro AP gleich dem Nachschub im Intervall. Aus dieser Bedingung haben Elmquist und Quastel ([22], S. 516) die Abhängigkeit der Freisetzung pro Reiz von der Reizfrequenz herzuleiten versucht mit der vereinfachenden Voraussetzung $p =$ konstant. Die übrigen Voraussetzungen entsprechen unseren Hypothesen (1), (2) und (3). Ihre Formel gilt in erster Näherung nur für hohe Reizfrequenzen, wird aber in der zitierten Arbeit bis zur Frequenz 0 interpretiert. Die exakte Beziehung sei hier kurz angeführt.

Aus den Gln. (1), (2) und (3) folgt

$$Q = p \cdot V' \tag{18}$$

und

$$N = (V_0 - V' + pV')\left(1 - e^{-\frac{1}{\tau_1 f}}\right). \tag{19}$$

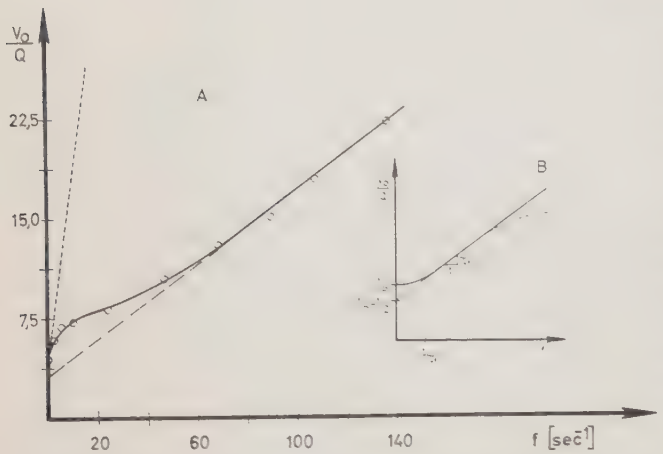

Abb. 10A u. B. Abhängigkeit der Ach-Freisetzung von der Frequenz im Curare-Block. A Die Abbildung ist einer Arbeit von Elmquist und Quastel [22] entnommen, in der der Kehrwert der mittleren Quantenzahl, die durch einen Reiz zwischen dem 20. und 40. EPP eines Tetanus freigesetzt wurde, über der Reizfrequenz aufgetragen wurde. Intracelluläre Ableitungen an menschlichen Intercostalmuskeln, Mittelwerte von 26 Endplatten, Temperatur 32° C. Wir haben den Originalmaßstab mit dem von Elmquist gemessenen Wert $V_0 = 375$ Quanten multipliziert, um besser mit den Gln. (20) und (20a) vergleichen zu können (s. Text). B Die Abbildung zeigt den theoretischen Verlauf von V_0/Q als Funktion von f entsprechend der Gl. (20) (ausgezogene Kurve), die sich nur im Bereich $f \leq 1/\tau_1$ von (20a) (langgestrichelt) unterscheidet. Der kurzgestrichelte Teil deutet schematisch die Abweichung an, die durch Zunahme des Freisetzungskoeffizienten bei höheren Frequenzen zu erwarten wäre

$N =$ Nachschub in Quanten pro Reizintervall, $f =$ Reizfrequenz in sec^{-1}, die übrigen Symbole s. oben.

Mit $Q = N$ folgt durch einfache Umformung

$$\frac{V_0}{Q} = \frac{1}{1 - e^{-\frac{1}{\tau_1 f}}} + \frac{1}{p} - 1. \tag{20}$$

Für $\tau_1 \gg 1/f$ gilt

$$\frac{V_0}{Q} = \tau_1 \cdot f + \frac{1}{p} - \frac{1}{2}. \tag{20a}$$

Gl. (20a) entspricht der Formel von Elmquist und Quastel. In der Abb. 10B sind die Gln. (20) und (20a) schematisch dargestellt, ebenso die zu erwartende Abweichung durch Zunahme von p bei hohen Reizfrequenzen. Der theoretische Kurvenverlauf entspricht den von Elmquist gefundenen biologischen Werten (Abb. 10A) auf weite Strecken nicht. Aus dem annähernd linearen Teil der Kurve bei höheren Frequenzen läßt sich $\tau_1 = 0{,}14$ sec errechnen. Danach dürfte bei einer Reizfrequenz von 1,1/sec praktisch keine Depression auftreten, wenn für den Nachtransport entsprechend Gl. (2) Linearität gefordert wird. Elmquist und Quastel finden jedoch bei Reizung mit 1,1/sec ein Plateau von etwa 65% des ersten Potentials. Dieser Wert ist bei einem initialen Freisetzungskoeffizienten $p_0 = 0{,}35$ vertretbar mit einer Zeitkonstanten von etwa $\tau_1 = 1{,}5$ sec. Die einer solchen Zeitkonstanten entsprechende Gerade wurde in die Abb. 10A eingetragen (punktiert).

Der Befund entspricht den oben erwähnten Ergebnissen von Hubbard ([28], Abb. 8 und 9), der nach kurzen Tetani eine schnelle und eine langsame Phase der Rückbildung der Depression beobachtet hat. Bei starker Entleerung des Reservoirs an verfügbarem Ach durch frequente Reizung im Curare-Block scheint demnach der Ach-Nachschub zumindest beim Warmblüter ein nichtlinearer Prozeß zu sein. Es ist denkbar, daß die Nichtlinearität durch einen zusätzlichen Mechanismus bewirkt wird, der erst nach einigen Reizen voll zur Wirkung kommt und damit für ein weiteres von uns oft beobachtetes Phänomen verantwortlich ist: Im Verlauf einer Reizserie durchlaufen die EPP-Amplituden oft nach einigen Reizen ein Minimum (s. Abb. 9, Reizfrequenzen 50/sec und 25/sec), um dann wieder etwas anzusteigen. Dasselbe Phänomen zeigen auch einige Abbildungen in der zitierten Arbeit von Elmquist und Quastel [22]. Wir haben bisher nicht versucht, das Modell zu erweitern, da wir zunächst weitere biologische Experimente zu diesem Punkt durchführen wollen.

3.2.3. Lange Tetani und posttetanische Potenzierung. Die Untersuchung der Ach-Freisetzung während und nach langer tetanischer Reizung (einige 100 bis einige 1000 Reize) ist aus mehreren Gründen von Bedeutung:

1. Im Mg-Block findet man während kurzer Reizserien eine ständig zunehmende Bahnung der EPPs. Es ist die Frage, ob und in welchem Ausmaß die Ach-Freisetzung pro AP bei längerer tetanischer Reizung weiter gesteigert werden kann, und wodurch sie schließlich begrenzt wird.

2. Eine Analyse der Ach-Freisetzung während prolongierter Reizung in etwa blutisoionaler Badflüssigkeit sollte darüber Aufschluß geben, ob und unter welchen Bedingungen die Nachlieferung mit der Freisetzung Schritt hält.

3. Nach längeren Tetani bei höheren Frequenzen findet man sowohl im Magnesium- wie im Curare-Block eine langanhaltende posttetanische Potenzierung eines Test-EPPs [8, 27, 29, 33, 45, 47]. Hier könnte die Korrelation zwischen dem Verlauf der Ach-Freisetzung während des Tetanus und dem Verlauf der PTP Hinweise auf die zugrunde liegenden Mechanismen geben.

Der erste Punkt — Ach-Freisetzung im Verlauf längerer tetanischer Reizung im Mg-Block — ist von Braun, Schmidt und Zimmermann am Froschmuskel quantitativ untersucht worden [8]. Sie fanden eine auch nach mehreren 100 Reizen noch ständig zunehmende Bahnung, wenn anfänglich pro AP etwa ein Ach-Quantum freigesetzt wurde, bei größerer initialer Freisetzung stellte sich nach etwa 100—200 Reizen ein Plateau ein. Gelegentlich wurde sogar eine Wiederabnahme der EPP-Amplituden beobachtet, insbeson-

dere in Präparationen, die durch lange Reizung erschöpft waren. Danach ist anzunehmen, daß auch im Mg-Block die Ach-Nachlieferung der begrenzende Faktor für die Freisetzung bei längerer Reizung ist. Die Meßpunkte der Abb. 11 sind Ergebnisse eines Versuchs von Braun u. Mitarb. [8] und zeigen den Verlauf der Bahnung durch Tetani von 370 Reizen bei den Reizfrequenzen 20/sec und 50/sec. Im Modellversuch wurden die Parameter so gewählt, daß sich eine optimale Übereinstimmung bei der Frequenz 50/sec ergab. Dann wurde bei derselben Einstellung mit 20/sec gereizt. Die einzelnen Meßpunkte $Q_n^{\vee}/Q_1^{\vee}$ wurden wiederum durch eine Kurve verbunden. Die Übereinstimmung erscheint auch hier befriedigend.

Um einen Vergleich mit dem Warmblütermuskel zu ermöglichen, haben wir an 6 Endplatten (Zwerchfellphrenicuspräparat des Goldhamsters, Temperatur 30° C) mit einer initialen Freisetzung von 2—5 Quanten pro Reiz die Bahnung im Verlauf eines Tetanus von 250 Reizen bei 30/sec untersucht. Die mittlere EPP-Amplitude betrug nach 30 Reizen 134%, nach 110 Reizen 139%, nach 225 Reizen 142% der Amplitude des ersten EPP. Wie beim Kaltblüter nimmt also die Bahnung anfänglich schnell, im weiteren Verlauf

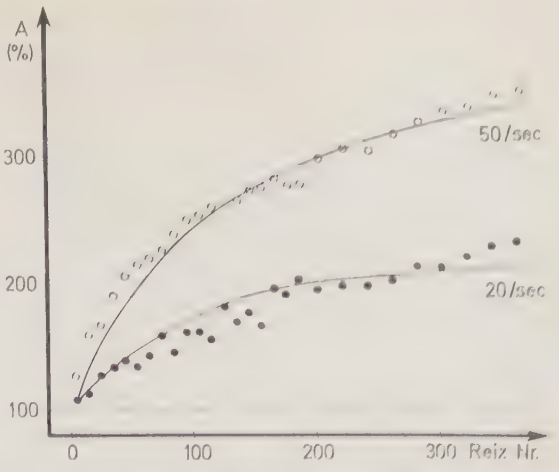

Abb. 11. Bahnung im Verlauf längerer Tetani im Mg-Block. Versuchswerte von Braun, Schmidt und Zimmermann ([8], Abb. 1), intracelluläre Ableitungen am Froschsartorius, Temperatur ca. 24° C. Bei den Frequenzen 20/sec und 50/sec wurden je 20 Serien von 370 Reizen in Intervallen von 3 min appliziert. Die mittlere Amplitude von 10 (2 - 200) bzw. 20 (201—370) aufeinanderfolgenden EPPs wurde in Prozent der mittleren Amplitude des ersten EPP jeder Serie aufgetragen. Im Modellversuch haben wir bei 20/sec und 50/sec $Q_n^{\vee}/Q_1^{\vee}$ registriert und die Meßpunkte durch eine Kurve verbunden

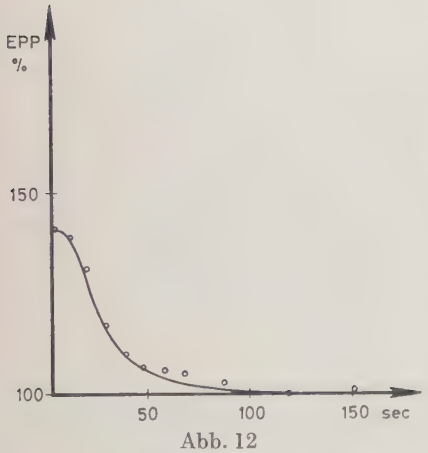

Abb. 12

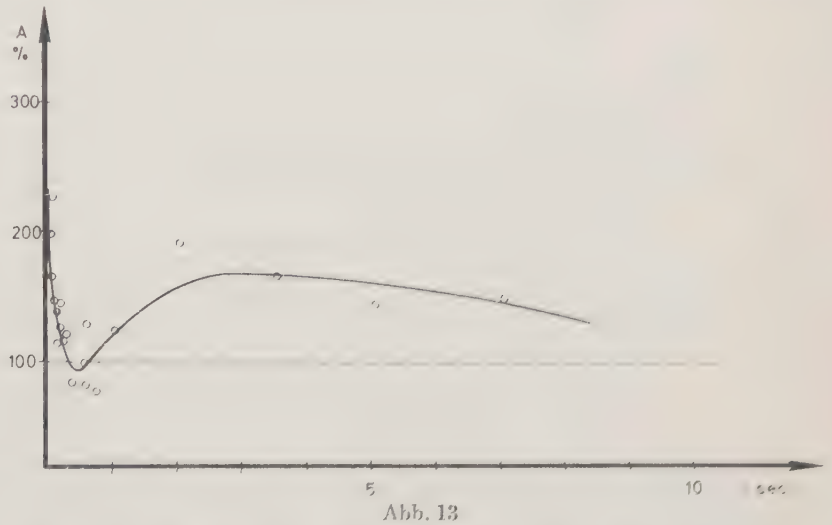

Abb. 13

Abb. 12. Posttetanische Potenzierung im Mg-Block. Experimentelle Daten von Hubbard und Schmidt ([30], Abb. 5). Extracelluläre Mikroableitung an einer Einzelfaser vom Rattenzwerchfell, Temperatur 35° C. Konditionierender Tetanus von 10 sec bei der Frequenz 200/sec. Danach wurden alle 0,5 sec Testreize appliziert je 6 (1. Minute) bzw. 20 (2. Minute) und danach aufeinanderfolgende EPPs gemittelt und der Mittelwert in Prozent der mittleren EPP-Amplitude vor der tetanischen Reizung aufgetragen. Die ausgezogene Kurve wurde im Modellversuch als $Q^{+}(t)/Q_1^{\vee}$ nach entsprechender Reizung abgeleitet

Abb. 13. Zweiphasische PTP im Mg-Block. Experimentelle Daten von Hubbard ([29], Abb. 5). Intracelluläre Ableitungen am Rattenzwerchfell, Temperatur 35—37° C. Registriert wurde die EPP-Amplitude nach einem Testreiz, der mit unterschiedlichem Intervall nach einem Tetanus von 50 Reizen bei der Frequenz 200/sec appliziert wurde. Dies wurde an einer Endplatte für jedes Intervall 4—6mal wiederholt und der Mittelwert des Verhältnisses Test-EPP zu Kontroll-EPP (ohne vorangehende tetanische Reizung) von Versuchen an 8 Endplatten über der Intervallänge aufgetragen. Im Modellversuch wurde die ausgezogene Kurve $Q^{+}(t)/Q_1^{\vee}$ registriert

sehr langsam zu. An einer Endplatte nahmen die Amplituden zwischen dem 30. und 50. Reiz vorübergehend wieder ab entsprechend dem Modellversuch der Abb. 3C.

Bei höherer Reizfrequenz (200/sec) und höherer Temperatur (38° C) fand Liley [45] am Rattenzwerchfell eine bis zu mehreren 1000 Reizen noch zunehmende tetanische Bahnung und eine etwa gleich hohe PTP. Danach ist die Bahnung während langer Reizserien im Mg-Block mit der PTP eng korreliert.

In dem biologischen Experiment, das der Abb. 12 zugrunde liegt, haben Hubbard und Schmidt am Rattenzwerchfell extracelluläre EPPs einer Einzelfaser vor und nach einem konditionierenden Tetanus von 2000 Reizen bei 200/sec alle 0,5 sec registriert [30]. Die ausgezogene Kurve wurde im Modellversuch als $Q^{+}(t)/Q_1^{\vee}$ abgeleitet. Die nach oben konvexe Krümmung der Kurve zu Beginn kommt dadurch zustande, daß das Reservoir an verfügbarem Ach auf 60% vermindert war und sich während der ersten Sekunden wieder auflud.

Auch nach 50 Reizen kann man gelegentlich eine PTP finden. In dem in der Abb. 13 dargestellten Versuch von Hubbard ([29], Abb. 5) erkennt man, wie

die Bahnung zunächst innerhalb der ersten 200 msec auf den Ausgangswert abklingt (vgl. mit den Abb. 3, 4 und 6), bei größeren Intervallen dann aber die Test-EPPs wieder ansteigen.

Wir haben diesen Versuch so interpretiert (s. Abschnitt 3.1), daß es wiederum zu einer Verminderung des Reservoirs an verfügbarem Ach gekommen ist. Während der ersten 200 msec nimmt die durch den Tetanus bedingte Erhöhung des Freisetzungskoeffizienten in einer ersten schnellen Phase ab, um dann nur sehr langsam weiter auf den Ausgangswert abzusinken.

Nach etwa 0,7 sec ist die posttetanische Erhöhung des Freisetzungskoeffizienten durch die Verminderung des verfügbaren Ach maskiert und tritt erst nach der leerung des Ach-Speichers gehalten und, unter Voraussetzungen, die den Gln. (1), (2) und (3) entsprechen, daraus den Speicherinhalt mit 23000 Quanten berechnet. Ein Versuch aus der zitierten Arbeit [22] ist in Abb. 14 dargestellt. Die Autoren haben die EPP-Amplituden in mV über der Summe der vorangegangenen EPP-Amplituden aufgetragen. Die einem Einzelquant entsprechende Depolarisationshöhe veränderte sich im Verlauf des Versuches nicht. Bei dem Modellversuch wurde die Summe der „EPP" durch Integration direkt gemessen und für die horizontale Ablenkung auf dem Kathodenstrahloscillographen benutzt. Bei diesem Versuch gab es außer dem Vergleich der mit dem Modell gewonnenen Kurve mit den Meßpunkten eine zweite Kontrolle: Elmquist und Quastel gaben

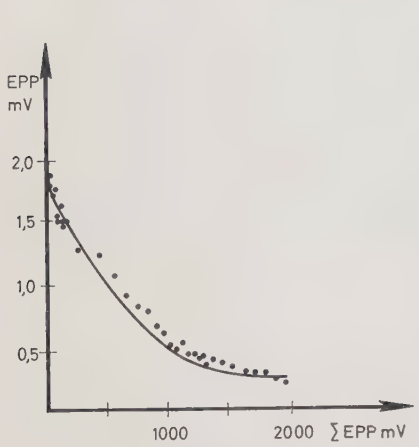

Abb. 14

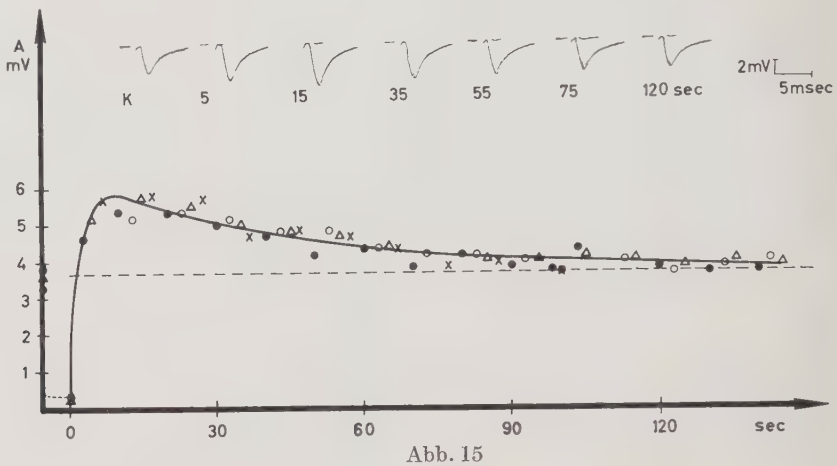

Abb. 15

Abb. 14. Zunehmende tetanische Depression bei erschöpfender frequenter Reizung im Curare-Block. Die Meßpunkte wurden einem Versuch von Elmquist und Quastel ([22], Abb. 13) entnommen. Intracelluläre Ableitungen an menschlichen Intercostalmuskeln, Temperatur 32° C. Die EPP-Amplitude im Verlauf einer 395 sec währenden Reizung mit der Frequenz 10/sec wurde über der Summe der vorangegangenen EPP-Amplituden aufgetragen. Während des Versuchs änderte sich die aus der Streuung der EPP-Amplituden berechnete Depolarisationsamplitude für ein Einzelquantum nicht. Beim Modellversuch wurde einmal $Q_n^{\vee}$, zum anderen $\sum_{i=1}^{n} Q_i^{\vee}$ durch Integration direkt gemessen und dem biologischen Versuch entsprechend aufgetragen. Die Reizdauer im Modellversuch betrug 365 sec

Abb. 15. Posttetanische Potenzierung im Curare-Block. Intracelluläre Ableitungen am Goldhamsterzwerchfell, Temperatur 30° C. Nach tetanischer Reizung mit 500 Reizen bei der Frequenz 100/sec wurde alle 10 sec ein Testreiz appliziert. Dieser Vorgang wurde 4mal wiederholt, wobei allein das Intervall zwischen dem Ende des Tetanus (Zeit 0 auf der Abszisse) und dem 1. Testreiz variiert wurde. Die Amplitude des ersten und letzten EPP des Tetanus sowie der Test-EPP in der PTP wurde mit verschiedenen Symbolen für die 4 Serien aufgetragen: (1. Testreiz nach 3 sec (○), 5 sec (△), 7 sec (+), 10 sec (•)]. Im Modellversuch wurde nach der Reizung (500 Reize, 100/sec) die ausgezogene Kurve als $Q^+(t)/Q_1^{\vee}$ registriert und so aufgetragen, daß $Q_1^{\vee}$ gleich dem Mittelwert der ersten EPP des Tetanus war (gestrichelte Linie). Oben in der Abbildung sind Originalregistrierungen abgebildet (positive Ablenkung nach unten, Potentialanstieg retuschiert): Kontroll-EPP (K) vor tetanischer Reizung und EPPs in verschiedenen Intervallen nach Ende des Tetanus

Auffüllung des Reservoirs R deutlich hervor. Die quantitative Simulierung am Modell führt zu einer guten Übereinstimmung. Damit werden die 2 Typen der PTP, die Hubbard nach diesen und ähnlichen Experimenten forderte, auf einfache Weise erklärt.

Bei längerer frequenter Reizung im Curare-Block bleibt das sich anfangs einstellende Plateau der EPP-Amplituden nicht konstant, sondern nimmt langsam weiter ab [11, 15, 22, 33, 42, 45]. Wir haben diese Befunde experimentell bestätigt und darüber hinaus gefunden, daß der zeitliche Verlauf dieser Depression gut reproduzierbar ist, wenn man in einer Cholin enthaltenden Blutersatzlösung zwischen den einzelnen Serien von mehreren 1000 Reizen Intervalle von 10 bis 15 min einhält [59]. Elmquist und Quastel [22] haben diesen langsamen weiteren Abfall der EPP-Amplituden für die Folge einer zunehmenden Ent- eine Reizdauer von 395 sec an, im Modellversuch wurde 365 sec gereizt.

Obwohl im Curare-Block ein Tetanus von mehreren 100 Reizen bei Frequenzen über 50/sec immer zu einer zunehmenden Depression der EPP-Amplituden führt, läßt sich doch nach einigen Sekunden durch Testreize eine posttetanische Potenzierung nachweisen, die einige Minuten andauern kann [22, 33, 47].

Der Verlauf der PTP nach einer bestimmten konditionierenden Reizung ist an einer Endplatte gut reproduzierbar, wie der Versuch der Abb. 15 beweist. Hier wurde nach einer konditionierenden Reizung mit 500 Reizen bei der Frequenz 100/sec alle 10 sec ein Testreiz gegeben und der ganze Vorgang nach jeweils 5 min 4mal wiederholt. Dieser Versuch ließ sich mit dem Modell besonders leicht simulieren und stellt quantitativ keinen kritischen Test für das Modell dar,

da sowohl das Ausmaß der PTP wie auch die nahezu exponentielle Rückbildung durch mehrere Einstellungen der Parameter Δp, τ_3, τ_4 und C_4/C_3 beschrieben werden können (s. Abschnitt 3.1).

Die Ursache der PTP ist noch weitgehend umstritten. Während einige Autoren eine Vergrößerung des Freisetzungskoeffizienten annehmen [22, 47], führen andere die PTP auf eine Vermehrung des verfügbaren Ach zurück [8, 19, 20]. Wir haben dazu ein Experiment im Curare-Block durchgeführt (Abb. 16, intracelluläre Ableitungen am Goldhamsterzwerchfell), das im Prinzip ähnlich einem Versuch von Liley und der PTP aufgetragen. Durch die ausgezogene Kurve sind wiederum die Amplituden der „EPP" im Modellversuch verbunden worden. Bei der Voraussetzung, daß die PTP auf einer Vermehrung des verfügbaren Ach beruht, sollte man erwarten, daß sich das Verhältnis $Q_n^{\check{}}/Q_1^{\check{}}$ in der PTP nicht ändert (gestrichelte Kurve). Die experimentellen Befunde sprechen eindeutig gegen diese Hypothese. Vielmehr fällt auf, daß trotz vergrößertem ersten Potential in jeder Serie das Plateau der Testserien in der PTP kaum zunimmt. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß der Nachtransport bei frequenter Reizung im Curare-Block der limitie-

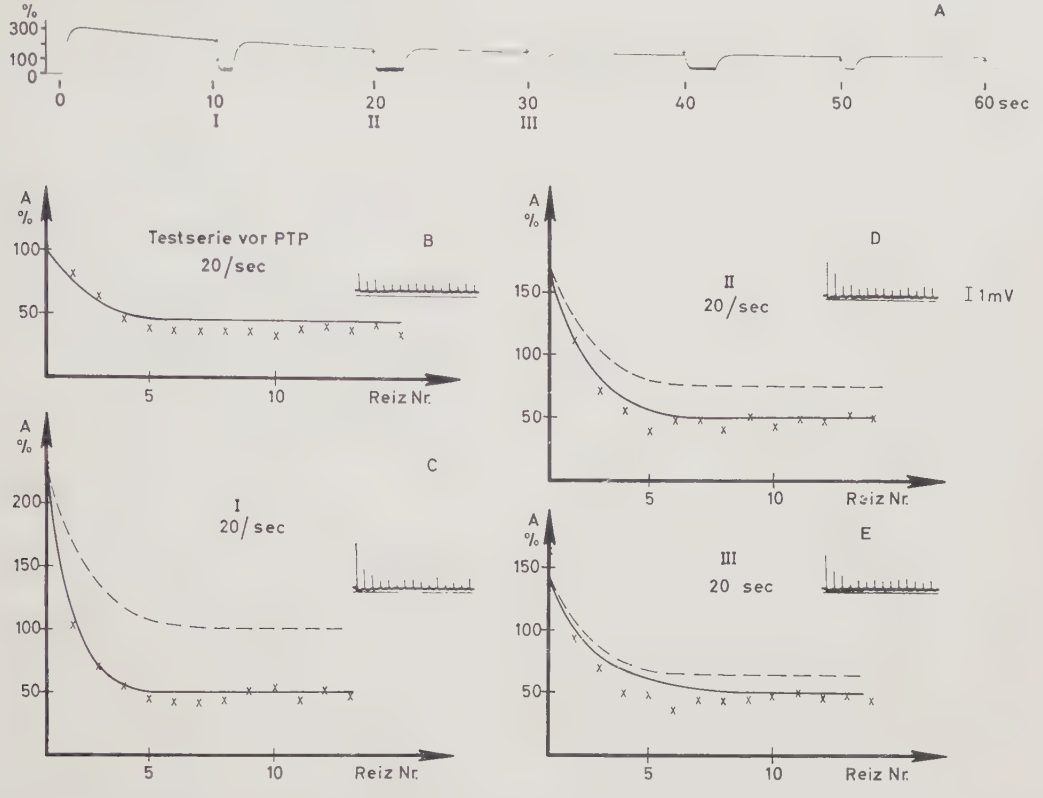

Abb. 16. Untersuchung der PTP im Curare-Block mit kurzen Tetani. Intracelluläre Ableitungen am Goldhamsterzwerchfell, Temperatur 30° C. Eine Testserie von 15 Reizen bei der Frequenz 20/sec wurde vor und alle 10 sec nach einem Tetanus von 7 sec bei der Frequenz 100/sec appliziert. Die Originalaufzeichnungen einer Kontrollserie sowie der Testserien 10 sec (I, 1. Potential retuschiert), 20 sec (II), 30 sec (III) nach Ende des Tetanus sind in B bzw. C, D, E abgebildet. Die Amplituden (×) wurden in Prozent der Amplitude des 1. Potentials der Kontrollserie über der Reizzahl aufgetragen. Im Modellversuch wurden bei der gleichen Reizung einmal die kurzen Reizserien als $Q_n^{\check{}}/Q_1^{\check{}}$ gemessen ($Q_1^{\check{}} = 1$. Potential der Kontrollserie), in B, C, D, E den biologischen Werten entsprechend aufgetragen und durch eine Kurve verbunden. A ist eine Originalaufzeichnung von $Q^+(t)/Q_1^{\check{}}$ nach dem Ende des Tetanus (Zeit 0). Der Verlauf der PTP ist ähnlich dem Versuch der Abb. 15. Am biologischen Objekt wurden nur die den Einbrüchen entsprechenden Testserien gemessen, deren 1. Potential (+) in Prozent des 1. Potentials der Kontrollserie eingetragen wurde

North [47] mit extracellulären Massenableitungen am Rattenzwerchfell war. Ein kurzer Tetanus wurde als Testserie vor und in bestimmten Abständen nach konditionierender Reizung mit 700 Reizen bei der Frequenz 100/sec gegeben. Abb. 16A ist eine Originalregistrierung des Quotienten $Q^+(t)/Q_1^{\check{}}$ im Modellversuch. Die Zeit 0 markiert das Ende des konditionierenden Tetanus. In der folgenden PTP von maximal etwa 300% wurde alle 10 sec die Testserie von 16 Reizen bei 20/sec appliziert. Im entsprechenden Tierexperiment konnten nur die den „Einbrüchen" entsprechenden EPP-Serien, deren erstes Potential in 16A als + eingetragen ist, registriert werden. Die Testserie vor der PTP sowie die ersten 3 Serien in der PTP sind in B bzw. C, D, E als Originalregistrierung abgebildet und in Prozent des ersten Potentials der Testserie vor

rende Faktor ist und daß dieser durch eine Erhöhung des Freisetzungskoeffizienten nicht wesentlich beeinflußt wird.

4. Diskussion

4.1. Eignung der biologischen Daten für Modelluntersuchungen

Der Versuch, ein biologisches System durch ein Modell abzubilden, ist nur dann sinnvoll, wenn die systematischen und statistischen Abweichungen der über das System vorliegenden experimentellen Daten nicht zu groß sind.

Die Ach-Freisetzung wurde im biologischen Experiment indirekt an Hand der postsynaptischen Wirkung des Ach gemessen. Die einem Einzelquant entsprechende Depolarisationshöhe (unit potential) ist bei

einer bestimmten Zusammensetzung der Badflüssigkeit an einer Endplatte konstant, solange die Ach-Synthese nicht gehemmt wird [17, 18, 23, 35]. Bei den in dieser Arbeit erwähnten Untersuchungen ändert sich die postsynaptische Empfindlichkeit für Ach nicht, eine merkliche Desensibilisierung der Receptoren ist nicht zu befürchten [54]. Daraus ist zu schließen, daß die Ach-Menge pro Einzelquant konstant ist.

Eine lineare Beziehung zwischen EPP-Amplitude und der Zahl der freigesetzten Ach-Quanten besteht aber nur im Bereich von EPPs bis etwa 2 mV. Bei größeren Amplituden kann die Abweichung durch eine Korrektur eliminiert werden [50]. Wir haben diese Korrektur nicht durchgeführt, da beim überwiegenden Teil der von anderen Autoren übernommenen Ergebnisse keine genauen Angaben über die absolute EPP-Amplitude und das Membranruhepotential gemacht wurden. Dadurch ist die einem großen EPP entsprechende Quantenzahl im Vergleich zu einem kleineren zu gering angesetzt worden. Diese systematische Abweichung könnte sich allenfalls bei den Versuchen der Abb. 6, 7, 11, 13, 15 ausgewirkt haben und dürfte in jedem Fall unter 10% liegen.

In den biologischen Daten sind ohnehin zufällige Abweichungen enthalten. Diese können bedingt sein:

1. Durch die Ableitungsbedingungen (z.B. Widerstandsrauschen der Mikroelektroden).

2. Durch unterschiedliche Größe der einzelnen Ach-Quanten (Variationskoeffizient etwa 0,2) [7, 14, 44].

3. Durch die Quantelung des Freisetzungsprozesses.

Letztere Ursache überwiegt bei weitem, so daß gerade aus der Streuung der EPP-Amplitude die Quantenzahl berechnet werden kann. Diese Streuung maskiert jedoch häufig eine Bahnung oder Hemmung, besonders bei niedrigen Quantenzahlen (Mg-Block). Selbst nach einer größeren Zahl gleichartiger Ableitungen bleibt der mittlere Fehler des Mittelwertes oft so groß, daß beim Vergleich mit dem Modell ein relativ breiter Spielraum gegeben ist, der Test demnach nicht streng genug ausfällt (s. z.B. Abb. 5). Einige Autoren haben versucht, durch Mittelung der Meßergebnisse an mehreren Endplatten die Streuung des Mittelwertes zu vermindern (z.B. Abb. 10, 13). Dieses Verfahren ist jedoch problematisch, da z.B. die Empfindlichkeit verschiedener Endplatten desselben Präparates auf die Ca- und Mg-Konzentrationen unterschiedlich ist. Wenn etwa der mittlere Verlauf der tetanischen Depression in einem bestimmten Ionenmilieu nach Messungen an einer größeren Zahl von Endplatten berechnet wird, so läßt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob quantitativ der gleiche Verlauf auch an einer einzelnen Endplatte möglich wäre. Eine ähnliche Einschränkung betrifft den Versuch der Abb. 8, in dem eine „Mittelwertbildung" durch extracelluläre Ableitung der Massenpotentiale am Gesamtmuskel vorgenommen wurde.

Die den Modellversuchen zugrunde gelegten Experimente stellen eine kleine Auswahl typischer Versuche aus der sehr umfangreichen Literatur über die neuromuskuläre Übertragung dar. Für fast alle Versuche lassen sich ähnliche Experimente anderer Autoren angeben, die zu qualitativ übereinstimmenden Resultaten geführt haben. Die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen (Nerv-Muskelpräparate vom Warmblüter oder Kaltblüter, Zusammensetzung der Badflüssigkeit, Temperatur, Reizprogramm usw.) lassen jedoch häufig einen quantitativen Vergleich nicht zu, zumal sich 2 Endplatten desselben Präparates erheblich unterscheiden können. Aus diesen Gründen muß die Anpassung der Modell-Parameter an die experimentellen Daten bei jedem Versuch neu durchgeführt werden. Die Möglichkeit, unterschiedliche Versuche an verschiedenen Präparaten zu beschreiben, spricht einerseits für eine Plastizität des Modells, die ein Charakteristikum von Analogmodellen ist; auf der anderen Seite ist die Zahl der experimentellen Daten im Einzelversuch oft sehr gering. Es fehlen noch Untersuchungen mehrerer verschiedener Phänomene während und nach frequenter Reizung an *einer* Endplatte. Die Simulierung eines solchen Experimentes wäre ein strengerer Test für das Modell, als es die bisherigen Untersuchungen sein können.

4.3. Die formale Beschreibung der experimentellen Daten durch das Modell

Die quantitative Beschreibung einer Menge vorgegebener, nicht bereits in sich widersprüchlicher experimenteller Daten durch ein Modell ist bei hinreichender Komplexität des Modells immer möglich. Ein Modell ist aber nur dann als methodisches Hilfsmittel brauchbar, wenn es relativ einfach im Vergleich zum untersuchten System ist. Einfach im Hinblick auf die formale Beschreibung der Meßergebnisse ist ein Modell, wenn eine größere Zahl von experimentellen Daten durch relativ wenige Gleichungen mit wenigen Parametern beschrieben werden kann. Von Berman [3] wurde deshalb vorgeschlagen, die Komplexität eines Modells erstens durch seine Ordnung festzulegen, d.h. durch die Zahl der vorkommenden unabhängigen Funktionen und Gleichungen, zweitens durch die Zahl der Parameter bei einer gegebenen Ordnung. Die Ordnung unseres Modells wäre demnach 4, die Zahl der Parameter 8 (τ_1, τ_2, τ_3, τ_4, C_1/C_2, C_3/C_4, p_0, Δp). Es erscheint wenig wahrscheinlich, daß ein Modell von geringerer Komplexität existiert, das die Gesamtheit der experimentellen Daten mit ähnlich guter Übereinstimmung beschreibt. Würde man nämlich einzelne der Variablen U_1, U_2, U_3 oder U_4 konstant setzen oder einen der Parameter willkürlich variieren, könnten jeweils bestimmte Experimente nicht mit genügender Annäherung simuliert werden. Ob Modelle von vergleichbarer Komplexität, aber andersartiger Struktur zu einer ähnlichen Übereinstimmung mit den Experimenten führen könnten, ist schwierig zu beantworten. Hierauf wird bei der Diskussion der zugrunde liegenden Hypothesen einzugehen sein.

Bei der Auswahl der Werte für die Modellparameter zur Beschreibung eines bestimmten Versuchs wurden jeweils die im Modellversuch registrierten Kurven mit den entsprechenden experimentellen Daten verglichen und die Parameter so lange schrittweise verändert, bis die Übereinstimmung optimal war. Zur Simulierung eines einzelnen Experiments war meist nur die Festlegung eines Teils der Parameter kritisch, während bei den übrigen die Festlegung der Größenordnung genügte. Ein verhältnismäßig großer Anteil der Meßergebnisse mußte zur Festlegung der Parameter verwandt werden. Der anschließend „vorausgesagte" Teil der Ergebnisse war relativ gering. Hieraus folgt die Notwendigkeit, möglichst viele verschiedene Untersuchungen an einer Endplatte durchzuführen. Auch dann dürfte die Simulierung nicht immer eindeutig

sein; denn im Curare-Block (normale Mg- und Ca-Konzentration) sind die Veränderungen des Freisetzungskoeffizienten, im Mg-Block die Menge an verfügbarem Ach schwierig zu bestimmen. Da wir bisher nicht wissen, wie sich die Parameter beim Übergang von einer Badflüssigkeit zur anderen verändern, bleibt die Aufgabe offen, Versuche zu entwerfen, bei denen durch Reizung in einer Badlösung sämtliche Parameter festgelegt werden können.

Die Beurteilung der Übereinstimmung durch bloße Inspektion der Meßwerte und Kurven ist etwas willkürlich. Geeignete quantitative Verfahren zur Ermittlung der optimalen Annäherung der Parameter, ihrer Streuung und quantitativer Angaben über die Übereinstimmung von Modell und experimentellen Daten sind entwickelt worden [2, 53]. Derartige Untersuchungen sollen auch mit dem vorliegenden Modell durchgeführt werden, wenn umfangreicheres Datenmaterial von einzelnen Endplatten vorliegt.

Eine weitere Aufgabe ergibt sich aus den systematischen Abweichungen von Modellexperimenten und biologischen Untersuchungen der Ach-Freisetzung im Curare-Block bei höheren Reizfrequenzen.

Die hier notwendige Erweiterung, die zu einem Modell höherer Komplexität führen wird, soll entsprechend der Konzeption des Modells als Analogmodell im Zusammenhang mit den möglichen zugrunde liegenden Mechanismen im folgenden Abschnitt erörtert werden.

4.4. Die Analogiebeziehungen zwischen Modell und biologischem System

Wenn sich nach Reizung eines biologischen Systems die Meßwerte der Ausgangsgrößen als Funktion der Reizparameter und der Zeit mit Hilfe einer einfachen Gleichung darstellen lassen, so kann man aus dieser Gleichung meist keine Rückschlüsse auf die Wirkungsbeziehungen innerhalb des Systems ziehen. Die Änderungsgeschwindigkeit einer biologischen Größe ist in der Regel aufschlußreicher als ihr absoluter Wert. Lassen sich daher die Meßergebnisse als Lösungen einer Differentialgleichung oder eines Systems von Differentialgleichungen bei unterschiedlichen Anfangsbedingungen darstellen, so kann man erwarten, daß auch der biologische Prozeß, der zu den gemessenen Veränderungen geführt hat, approximativ beschrieben wird. Bei relativ komplexen Systemen, in denen, wie im vorliegenden Fall, nur eine Ausgangsgröße meßbar ist, muß gefragt werden, ob nicht ein anderes System von Differentialgleichungen vergleichbarer Komplexität mit den Meßwerten vereinbar und biologisch möglich wäre.

Die Grundhypothese unseres Modells fordert, daß die Zahl der freigesetzten Ach-Quanten sich als Produkt zweier Veränderlicher darstellen läßt: der Anzahl der unmittelbar für die Freisetzung verfügbaren Quanten V und des Freisetzungskoeffizienten p. Die Hypothese wurde von del Castillo und Katz [14] aufgestellt, weil sie auf einfache Weise die statistischen Schwankungen der Zahl der freigesetzten Quanten pro Reiz erklärt. Der Freisetzungskoeffizient wurde in dieser Hypothese als die Wahrscheinlichkeit definiert, mit der eines der V-Quanten des Reservoirs durch ein AP freigesetzt wird. Die enge Korrelation von hoher initialer Ach-Freisetzung mit relativer Depression im Verlauf einer Reizserie sowie die exponentielle Rückbildung dieser Depression nach der Reizung haben diese Hypothese gestützt. Infolgedessen konnte Martin [51] in einem kürzlich erschienenen Übersichtsreferat betonen, daß das Reservoir an verfügbarem Ach und der Freisetzungskoeffizient p als ebenso reale Größen anzusehen seien wie die Zahl der freigesetzten Quanten Q.

In dieser Hypothese wird nichts über die Bindung, in der das Ach im Reservoir vorliegt, und über die chemischen oder physikalischen Vorgänge bei dem Freisetzungsprozeß ausgesagt. Als Ursache der Quantelung des Freisetzungsprozesses wird angenommen, daß der Überträgerstoff in den im Durchmesser etwa 300 Å messenden Vesikeln angereichert ist, die elektronenoptisch in den motorischen und vielen anderen Nervenendigungen beschrieben wurden [1, 4, 55—58, ausführliche Diskussion s. Referenzen 18, 20, 35, 57]. Die Zahl der unmittelbar freisetzbaren Quanten V könnten danach der Zahl der der Innenseite der Membran anliegenden oder der pro Zeiteinheit auftreffenden Vesikel entsprechen. Die übrigen Vesikel im Axoplasma würden den Speicher Sp (Abb. 1) ausmachen, der durch Resynthese ständig nachgefüllt wird. Die Brownsche Bewegung der Vesikel im Axoplasma dürfte zu einer gleichmäßigen Verteilung führen und könnte so den kurzzeitigen Nachschub in das Reservoir an freisetzbaren Ach-Vesikeln bewirken. Bei längerer Reizung mit hoher Ach-Freisetzung wäre zu erwarten, daß sich ein Gradient in der Vesikeldichte pro Volumeneinheit senkrecht zur Membranfläche ausbildet. Die Annahme eines homogenen Speichers ist deshalb sicherlich stark vereinfachend und kann nur als erste Näherung angesehen werden.

Bei den bisher erwähnten Untersuchungen war die Ach-Menge eines Einzelquants konstant. Wird die Ach-Synthese durch Hemicholinium blockiert, so kommt es nach längerer Reizung zu einer Verminderung der Quantengröße [23]. Aus diesen Versuchen ist im Rahmen der Vesikeltheorie zu schließen, daß die Ach-Konzentration in den Vesikeln nicht konstant, sondern abhängig von der Ach-Konzentration im Axoplasma ist, die wiederum von der Ach-Synthese aufrechterhalten wird. Wenn die Vesikel bei der Freisetzung zerstört werden, so müßte eine von der Ach-Synthese zu trennende Neubildung von Vesikeln erfolgen. Diese würde der „Synthese" (Sy) in Abb. 1 in unserem Modell entsprechen. Zur Darstellung der eigentlichen Ach-Synthese, der Verteilung des Ach im Axoplasma und der Beziehungen zur Quantengröße, müßte das Modell erweitert werden.

Die Nachlieferungsgeschwindigkeit an freisetzbarem Ach in das Reservoir wurde bei unverändertem Speicher proportional der Entleerung des kleinen Reservoirs angenommen [Gl. (2)]. Da für diesen Fall systematische Abweichungen des Modells von den Meßergebnissen am biologischen Objekt vorlagen (s. die Abb. 9 und 10), ist zu fragen, ob außer diesem „passiven", nur von der Entleerung abhängigen Transportmechanismus, ein „aktiver", durch die frequente Reizung bewirkter Mechanismus einen verstärkten Transport hervorrufen könnte.

Durch Hyperpolarisation der motorischen Nervenendigungen wird eine über etwa 15 sec langsam zunehmende Steigerung der Ach-Freisetzung pro AP bis auf das 20fache des Ausgangswertes erreicht, die auch im Verlauf eines Tetanus im Curare-Block erhalten

bleibt (im Gegensatz dazu s. Abb. 16), und sich nach Abschalten des hyperpolarisierenden Stromes verzögert zurückbildet [30, 31]. Ein depolarisierender Strom ruft eine schneller einsetzende und relativ geringere Verminderung der Freisetzung hervor [32]. Dagegen ist bei gleichmäßiger Depolarisation durch Erhöhung der Kalium-Konzentration in der Badlösung die Zahl der freigesetzten Quanten pro AP vermehrt [61]. Zur Erklärung dieses Vorganges kann angenommen werden [31], daß die Ach-tragenden Partikel negativ geladen sind und durch das elektrische Feld in Richtung auf die Membran beschleunigt werden, so daß dort eine größere Anzahl von Kollisionen stattfindet.

Es erhebt sich die Frage, ob dieser Mechanismus einer aktiven Mobilisation von Ach-Quanten auch physiologische Bedeutung haben und eventuell für die verstärkte Nachlieferung bei tetanischer Reizung mit hohen Frequenzen im Curare-Block verantwortlich sein könnte. Sowohl beim Warmblüter wie auch beim Kaltblüter wird das AP aktiv in die marklosen feinen Nervenendigungen fortgeleitet [9, 30, 36]. In der Nähe der Markscheiden kann man mit extracellulären Mikroelektroden einen triphasischen, weiter zum Nervenende hin einen biphasischen Aktionsstrom ableiten, der jeweils dem zeitlichen Verlauf der elektrischen F im Axoplasma in Membrannähe proportional sein dürfte [36]. Während der initialen positiven Phase des extracellulären APs ist das Feld so gerichtet, daß ein negativ geladenes Partikel abgestoßen wird. Es ist nicht ausgeschlossen, daß hierdurch ein Teil der Vergrößerung der Latenz bei der Verlängerung der Dauer einer elektrischen Depolarisation von Nervenendigungen, deren Erregbarkeit durch Tetrodotoxin gehemmt war, zu erklären ist [37, 38]. Die gesamte durch einen AP-Cyclus bewirkte Bewegung eines in der Nähe der Membran gelegenen geladenen Teilchens ist nur dann ungleich Null, wenn ein Nettostrom durch die nächstgelegenen Membranstellen fließt. Für eine Bewegung auf die Membran hin müßte man entweder fordern, daß die Nervenendigungen im Vergleich zu den markhaltigen Nerven länger oder stärker depolarisiert sind, oder, daß an bestimmten Stellen der Membran, die auch die für den Freisetzungsmechanismus erforderlichen Strukturen enthalten, besondere Permeabilitätsverhältnisse mit einer Gleichrichterwirkung vorliegen. Für letztere Hypothese könnten die von Birks, Huxley u. Katz [4] gefundenen, den sekundären synaptischen Spalten gegenüber gelegenen Anhäufungen von Vesikeln in Membrannähe sprechen. Schließlich könnte die Ach-Freisetzung selbst eine lokale, zu einer verstärkten Mobilisierung führende Potentialschwankung hervorrufen. Bei den heute zur Verfügung stehenden Methoden ist es schwierig, Experimente zur Überprüfung dieser Hypothesen zu entwickeln, zumal jede elektrische Polarisation der Nervenendigungen immer sowohl zu einer Membranpotentialänderung als auch zu einer Feldänderung im Innern der Nervenfaser führt.

Die Bahnung während und nach kurzen Reizserien sowie die posttetanische Potenzierung nach längeren hochfrequenten Tetani haben wir auf eine Zunahme des Freisetzungskoeffizienten p zurückgeführt. Wir befinden uns darin in Übereinstimmung mit den meisten anderen Autoren [22, 45, 47, 62]. Der Freisetzungskoeffizient p_0 für einen Einzelreiz ist stark von der Ca- und Mg-Konzentration der Badlösung abhängig. Es lag daher nahe, Änderungen von p während und nach frequenter Reizung auf Änderungen der wirksamen Ca-Konzentration in oder an der Innenseite der Membran zurückzuführen. Es sind jedoch auch andere Mechanismen möglich; denn die Natur des Freisetzungsprozesses ist noch weitgehend unklar. Der Amplitude des AP in der motorischen Nervenendigung scheint nicht die entscheidende Rolle zuzukommen, wie eine Zeitlang angenommen wurde, da eine Vergrößerung der AP-Amplitude in Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen sowohl mit einer Vergrößerung als auch mit einer Verkleinerung der Quantenzahl einhergehen kann [9, 30, 36].

Die enge Kopplung zwischen tetanischer Bahnung und PTP, wie sie in dem angegebenen Modell zum Ausdruck kommt, erscheint uns zwar als die naheliegendste Hypothese, ist aber experimentell noch nicht hinreichend belegt. Das verzögerte Einsetzen der PTP im Curare-Block spricht nicht dagegen, daß es sich um denselben Mechanismus wie im Mg-Block handelt, sondern ist Ausdruck der Wiederaufladung des Reservoirs an verfügbarem Ach. In diesem Zusammenhang ist die Spontanfreisetzung einzelner Quanten von Bedeutung, die bisher in dem Modell vernachlässigt wurde. Die Rate der Spontanfreisetzung ist wie die Freisetzung durch ein AP abhängig von der Mg- und der Ca-Konzentration in der Badflüssigkeit, und zwar läßt sich nach neueren Untersuchungen von Elmquist u. Feldmann [24] durch längeres Auswaschen in Ca-freier, EDTA-haltiger Badlösung beim Warmblüter die Freisetzungsrate bis auf nicht mehr meßbare Werte herabsetzen. Depolarisation der motorischen Nervenendigungen in einer Ca-haltigen Blutersatzlösung durch elektrischen Strom [16] oder mittels Erhöhung der K-Konzentration [46] erhöht die Zahl der pro Zeiteinheit spontan freigesetzten Quanten. Dabei ist bis zu etwa 40 mV Depolarisation der Logarithmus der Spontanrate etwa proportional der Depolarisation. Wird diese Beziehung in den Bereich stärkerer Depolarisation extrapoliert, so ist die Freisetzung von 100 und mehr Quanten durch ein AP in Bruchteilen einer Millisekunde durchaus zu erklären [46]. Spontanfreisetzung und Freisetzung durch ein AP scheinen danach auf einem gemeinsamen Ca-abhängigen Mechanismus zu beruhen.

Von del Castillo u. Katz [13] wurde angenommen, daß ein Träger X in der Membran durch Bildung einer Ca-Verbindung CaX aktiviert wird, so daß durch ein AP (und in geringerem Maße auch spontan) eine Ach-Freisetzung erfolgen kann. Die Rate der Spontanfreisetzung ist nach konditionierender Reizung erhöht [8, 10, 15, 22, 28, 29, 45]. Im Mg-Block geht diese Erhöhung der Bahnung nach kurzen Reizserien etwa parallel; das Ausmaß der Steigerung der Spontanrate ist jedoch wesentlich größer als die Zunahme der EPP-Amplituden, jeweils bezogen auf den Ruhewert [8, 29, 45]. Daraus wird verständlich, daß auch bei erschöpfender Reizung in etwa blutisoionaler Ersatzlösung trotz extremer Depression der EPP-Amplituden infolge Verminderung des verfügbaren Ach die Spontanrate stark erhöht ist [10, 15, 22]. Während unter diesen Bedingungen der Freisetzungskoeffizient pro AP höchstens auf das 3—4fache ansteigen kann, dürfte die Wahrscheinlichkeit für die Spontanfreisetzung auf ein Vielfaches zunehmen.

Wir möchten annehmen, daß die Spontanrate in ähnlicher Weise wie die Freisetzung durch ein AP als

ein Produkt aus der Menge an verfügbarem Ach und einem Freisetzungskoeffizienten r beschrieben werden kann, wobei r durch konditionierende Reizung in ähnlicher Weise wie p beeinflußt wird.

Coffein, daß keine Depolarisation hervorruft, aber an verschiedenen Membranen die Ca-Permeabilität erhöht, kann die Spontanrate der Ach-Freisetzung steigern, wenn sich Ca in der Badlösung befindet [24]. Es ist zu überlegen, ob die Depolarisation einen direkten Einfluß auf den Freisetzungsprozeß hat oder ob eine indirekte Einwirkung, etwa auf die Ca-Permeabilität, vorliegt. An einer durch Ca-Entzug blockierten Endplatte läßt sich durch mikroelektrophoretische Aufbringung von Ca-Ionen die Freisetzung wiederherstellen, wenn der Ca-Stoß kurz vor der Depolarisation gegeben wird; wenig später ist ein solcher Ca-Stoß unwirksam [40].

Es wurde oben erwähnt, daß die Ach-Freisetzung auf ein AP in den motorischen Nervenendigungen bzw. auf einen depolarisierenden Puls in mit Tetrodotoxin vorbehandelten Präparaten mit einer deutlichen Latenz folgt. Diese Latenz ist nicht konstant. Die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Latenzzeiten an einem synaptischen Punkt entspricht dem Verlauf der Freisetzungswahrscheinlichkeit [37]. Die starke Temperaturabhängigkeit dieses Verlaufs spricht dafür, daß der Prozeß durch chemische Reaktionen gesteuert wird [41]. In dem Modell haben wir die Freisetzungswahrscheinlichkeit durch einen rechteckförmigen Verlauf formal approximiert. Die zuletzt erwähnten Untersuchungen fordern eine Erweiterung des Modells ebenso wie die bisher vernachlässigte Spontanfreisetzung.

Dazu gehen wir von der Hypothese aus, daß die Freisetzungswahrscheinlichkeit für ein auf die Axonmembran auftreffendes Vesikel allein von der Bindung von Ca an bestimmte Gruppen R in der Membran abhängt. Dabei soll jede Gruppe R zwei Ca-Ionen bilden können, so daß folgende Reaktionsgleichungen bestehen:

$$\text{I} \qquad \mathrm{R} + \mathrm{Ca} \rightleftharpoons \mathrm{RCa},$$

$$\text{II} \qquad \mathrm{RCa} + \mathrm{Ca} \rightleftharpoons \mathrm{RCa_2}.$$

(Über die Ladung der Teilchen wird keine Annahme gemacht. Ca könnte als Ion Ca^{2+} oder auch als Verbindung CaY^{+} vorliegen.) Die wirksame Ca-Konzentration in der Membran sei in Ruhe gleich der im Modell angegebenen Konzentration (Ca_i), während (bzw. kurz nach) der Erregung sei sie jedoch wesentlich höher. Die Zeitkonstante der Gleichgewichtseinstellung sei bei der Reaktion I im Bereich einiger Millisekunden, bei der Reaktion II mehrmals so lang. Nur die RCa_2 sei für den Freisetzungsprozeß wirksam. Mg kann statt Ca gebunden werden, mit Mg besetzte Gruppen seien jedoch unwirksam.

Durch diese einfache Hypothese werden die Spontanfreisetzung und die Freisetzung durch ein AP auf einen gemeinsamen Mechanismus zurückgeführt. Der unterschiedliche Einfluß von konditionierender Reizung auf die Spontanrate und die Freisetzung durch ein AP, der Verlauf der Freisetzungswahrscheinlichkeit nach einem AP, der kompetitive Antagonismus zwischen Ca und Mg lassen sich danach auf einfache Weise erklären. Eine quantitative Überprüfung dieser Erweiterung wird z.Z. durchgeführt.

Wenn man die Grundhypothese des Modells akzeptiert [Gl. (1)], daß die Ach-Freisetzung durch ein Aktionspotential in den motorischen Nervenendigungen sich als Produkt zweier veränderlicher Größen, der Menge an unmittelbar verfügbaren Ach V und der Freisetzungskoeffizient p, darstellen läßt, dann dürfte unser Modell das System geringster Komplexität sein, das die Veränderung der Ach-Freisetzung während und nach frequenter Reizung annähernd beschreibt. Insbesondere erscheint die Zuordnung der tetanischen Depression zu einer Verminderung von V, der tetanischen Bahnung und der posttetanischen Potenzierung zu einer Vergrößerung von p gesichert. Infolge der geringen Komplexität des Modells werden die Einzelvorgänge in den motorischen Nervenendigungen noch weitgehend formal approximiert. Die oben angeführten Ansätze, das Modell zu erweitern, sollten zu einer differenzierteren Beschreibung von Teilfunktionen führen und die Spontanfreisetzung miteinbeziehen. Es muß jedoch nochmals darauf hingewiesen werden, daß die Zuordnung des Inhalts der Hypothesen zu der mathematischen Abstraktion, den Differentialgleichungen, noch nicht gesichert ist. So sprechen viele Befunde für eine entscheidende Bedeutung des Ca für den Freisetzungsprozeß; ob jedoch die Größen U_3 und U_4 in den Differentialgleichungen wirklich den beschriebenen Ca-Konzentrationen entsprechen und nicht evtl. Membranzuständen, kann sich erst sicher erweisen, wenn die experimentelle Methodik eine entsprechende Differenzierung durch direkte Messungen gestattet.

Unter physiologischen Bedingungen ist das Endplattenpotential nahezu immer überschwellig. Ob bei starker und andauernder Willkürinnervation eine Hemmung der neuromuskulären Übertragung zur „Ermüdung" beitragen kann, ist nicht sicher entschieden [42, 52]. Für die Funktion der motorischen Endplatte ist die Menge des freigesetzten Ach gleichgültig, solange die folgende Depolarisation überschwellig ist. Da bei frequenter Aktivierung der motorischen Nervenendigung in vivo eine Depression der Ach-Freisetzung zu erwarten ist (s.o. blutisoionale Ersatzlösungen), kann die biologische Bedeutung der Erhöhung des Freisetzungskoeffizienten und die verstärkte Nachlieferung bei höheren Reizfrequenzen darin liegen, daß ein Unterschwelligwerden eines EPPs verhindert wird.

Nicht nur an der neuromuskulären Synapse, sondern an sämtlichen Synapsen mit chemischer Erregungsübertragung scheint der Überträgerstoff in Form von Quanten freigesetzt zu werden (s. z.B. die Übersichtsreferate [20, 51]). Auch tetanische Bahnung, tetanische Depression und posttetanische Potenzierung werden an anderen Synapsen beobachtet (Zusammenfassung bei ECCLES [20]) und scheinen den Vorgängen an der motorischen Endplatte weitgehend zu entsprechen. Die Variabilität der Transmitterfreisetzung pro Aktionspotential kann eine wichtige Ursache für eine Nichtlinearität in den Eingangs- und Ausgangsbeziehungen eines Neurons sein. Bei der Konstruktion von Neuronenmodellen muß neben der postsynaptischen Integrationsfunktion die Modulation beachtet werden, die jede Afferenz durch variable Transmitterfreisetzung erfährt. Modifikationen des von uns angegebenen Modells könnten deshalb als Teilsysteme von Neuronenmodellen vorteilhaft verwandt werden.

Ich spreche meinen besonderen Dank Herrn Professor Dr. O. H. GAUER für die großzügige Förderung dieser Arbeit aus.

Mein Dank gilt auch den Herren Professor Dr. Dr. G. Fuchs, Prof. Dr. G. Senft, Priv.-Doz. Dr. O. J. Grüsser und Priv.-Doz. Dr. E. Zerbst für das Lesen des Manuskripts und wertvolle Anregungen.

An dieser Stelle sei auch den Herren cand. med. R. Sandweg und cand. med. H. Bauer für die Mithilfe bei einigen Experimenten und Fräulein J. Nöring für die sorgfältige technische Assistenz gedankt.

Literatur. 1. Anderson-Cedergren, E.: Ultrastructure of motor end-plate and sarcoplasmic components of mouse skeletal muscle fiber. J. Ultrastruct. Res., Suppl. 1 (1959). — 2. Berman, M., E. Shahn, and M. F. Weiss: The routine fitting of kinetic data to models. A mathematical formalism for digital computers. Biophys. J. **2**, 275—287 (1962). — 3. Berman, M.: The formulation and testing of models. Ann. N.Y. Acad. Sci. **108**, 182—194 (1963). — 4. Birks, R., H. E. Huxley, and B. Katz: The fine structure of the neuromuscular junction of the frog. J. Physiol. (Lond.) **150**, 134—168 (1960). — 5. Birks, R., and F. C. MacIntosh: Acetylcholine metabolism at nerve-endings. Brit. med. Bull. **13**, 157—161 (1957). — 6. Birks, R., and F. C. MacIntosh: Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion. Canad. J. Biochem. **39**, 787—827 (1961). — 7. Boyd, I. A., and A. R. Martin: The end-plate potential in mammalian muscle. J. Physiol. (Lond.) **132**, 74—91 (1956). — 8. Braun, M., R. F. Schmidt, and M. Zimmermann: Facilitation at the frog neuromuscular junction during and after repetitive stimulation. Pflügers Arch. ges. Physiol. **287**, 41—55 (1966). — 9. Braun, M., and R. F. Schmidt: Potential changes recorded from the frog motor nerve terminal during its activation. Pflügers Arch. ges. Physiol. **287**, 56—80 (1966). — 10. Brooks, V. B.: An intracellular study of the action of repetitive nerve volleys and of botulinum toxin on miniature end-plate potentials. J. Physiol. (Lond.) **134**, 264—277 (1956). — 11. Brooks, V. B., and R. E. Thies: Reduction of quantum content during neuromuscular transmission. J. Physiol. (Lond.) **162**, 298—310 (1962). —12. Del Castillo, J., and L. Engbaek: The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. J. Physiol. (Lond.) **124**, 370—384 (1954). — 13. Del Castillo, J., and B. Katz: The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. J. Physiol. (Lond.) **124**, 553—559 (1954a). — 14. Del Castillo, J., and B. Katz: Quantal components of the end-plate potential. J. Physiol. (Lond.) **124**, 560—573 (1954b). — 15. Del Castillo, J., and B. Katz: Statistical factors involved in neuromuscular facilitation and depression. J. Physiol. (Lond.) **124**, 574—585 (1954c). — 16. Del Castillo, J., and B. Katz: Changes in end-plate activity produced by presynaptic polarization. J. Physiol. (Lond.) **124**, 586—604 (1954d). — 17. Del Castillo, J., and B. Katz: Local activity at a depolarized nerve-muscle junction. J. Physiol. (Lond.) **128**, 396—411 (1955b). — 18. Del Castillo, J., and B. Katz: Biophysical aspects of neuro-muscular transmission. Progr. Biophys. **6**, 121—170 (1956). — 19. Eccles, J. C.: The physiology of nerve cells, 270 pp. Baltimore: John Hopkins Press 1957. — 20. Eccles, J. C.: The physiology of synapses, 316 pp. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964. — 21. Eccles, J. C., B. Katz, and S. W. Kuffler: Nature of the endplate potential in curarized muscle. J. Neurophysiol. **4**, 362—387 (1941). — 22. Elmquist, D., and D. J. M. Quastel: A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. J. Physiol. (Lond.) **178**, 505—529 (1965). — 23. Elmquist, D., and D. J. M. Quastel: Presynaptic action of hemicholinium at the neuromuscular junction. J. Physiol. (Lond.) **177**, 463—482 (1965). — 24. Elmquist, D., and D. S. Feldmann: Calcium dependance of spontaneous acetylcholine release at mammalian motor nerve terminals. J. Physiol. (Lond.) **181**, 487—497 (1965). — 25. Fatt, P., and B. Katz: An analysis of the end-plate potential recorded with an intra-cellular electrode. J. Physiol. (Lond.) **115**, 320—369 (1951). — 26. Feng, T. P.: Studies on the neuro-muscular junction. XVIII. The local potentials around N-M junctions induced by single and multiple volleys. Chin. J. Physiol. **15**, 367—404 (1940). — 27. Feng, T. P.: Studies on the neuromuscular junction. XXVI. The changes in the end-plate potential during and after prolonged stimulation. Chin. J. Physiol. **16**, 341—372 (1941). — 28. Hubbard, J. I.: Post-activation changes at the mammalian neuromuscular junction. Nature (Lond.) **184**, 1945 (1959). — 29. Hubbard, J. I.: Repetitive stimulation at the mammalian neuromuscular junction and the mobilization of transmitter. J. Physiol. (Lond.) **169**, 641—662 (1963). — 30. Hubbard, J. I., and R. F. Schmidt: An electrophysiological investigation of mammalian motor nerve terminals. J. Physiol. (Lond.) **166**, 145—167 (1963). — 31. Hubbard, J. I., and W. D. Willis: Hyperpolarization of mammalian motor nerve terminals. J. Physiol. (Lond.) **163**, 115—137 (1962a). — 32. Hubbard, J. I., and W. D. Willis: Reduction of transmitter output by depolarization. Nature (Lond.) **193**, 1924—1925 (1962b). — 33. Hutter, O. F.: Post-tetanic restoration of neuromuscular transmission blocked by d-Tubocurarine. J. Physiol. (Lond.) **118**, 216—227 (1952). — 34. Jenkinson, D. H.: The nature of the antagonism between calcium and magnesium ions at the neuromuscular junction. J. Physiol. (Lond.) **138**, 434—444 (1957). — 35. Katz, B.: The transmission of impulse from nerve to muscle, and the subcellular unit of synaptic action. Proc. roy. Soc. B **155**, 455—479 (1962). — 36. Katz, B., and R. Miledi: Propagation of elctric activity in motor nerve terminals. Proc. Roy. Soc. B **161**, 453—482 (1965a). — 37. Katz, B., and R. Miledi: The measurement of synaptic delay, and the time course of acetylcholine release at the neuromuscular junction. Proc. Roy. Soc. B **161**, 483—495 (1965b). — 38. Katz, B., and R. Miledi: The release of acetylcholine from nerve endings by graded electric pulses. Proc. Roy. Soc. B **167**, 23—38 (1967). — 39. Katz, B., and R. Miledi: The effect of temperature on the synaptic delay at the neuromuscular junction. J. Physiol. (Lond.) **181**, 656—670 (1965c). — 40. Katz, B., and R. Miledi: The timing of calcium action during neuromuscular transmission. J. Physiol. (Lond.) **189**, 535—544 (1967). — 41. Katz, B., and R. Miledi: The quantal release of transmitter substances in studies in physiology (D. R. Curtis, and D. R. McInteyre). Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1965d. — 42. Krnjević, K., and R. Miledi: Failure of neuromuscular propagation in rats. J. Physiol. (Lond.) **140**, 440—461 (1958). — 43. Kruckenberg, P., K.-D. Luschnat, R. Sandweg u. J. Lichey: Simulierung der Acetylcholinfreisetzung an den motorischen Nervenendigungen durch ein elektrisches Modell. Pflügers Arch. ges. Physiol. **289**, S. R7 (1966). 44. Liley, A. W.: An investigation of spontaneous activity at the neuromuscular junction of the rat. J. Physiol. (Lond.) **132**, 650—666 (1956a). — 45. Liley, A. W.: The quantal components of the mammalian end-plate potential. J. Physiol. (Lond.) **133**, 571—587 (1956b). — 46. Liley, A. W.: The effects of presynaptic polarization on the spontaneous activity at the mammalian neuromuscular junction. J. Physiol. (Lond.) **134**, 427—443 (1956c). — 47. Liley, A. W., and K. A. K. North: An electrical investigation of effects of repetitive stimulation on mammalian neuromuscular junction. J. Neurophysiol. **16**, 509—527 (1953). — 48. Lundberg, A., and H. Quilisch: Presynaptic potentiation and depression of neuro-muscular transmission in frog and rat. Acta physiol. scand. 30, Suppl. **111**, 11—120 (1953a). — 49. Lundberg, A., and H. Quilisch: On the effect of calcium on presynaptic potentation and depression at the neuromuscular junction. Acta physiol. scand. 30, Suppl. **111**, 121—129 (1953b). — 50. Martin, A. R.: A further study of the statistical composition of the end-plate potential. J. Physiol. (Lond.) **130**, 114—122 (1955). — 51. Martin, A. R.: Quantal nature of synaptic transmission. Physiol. Rev. **46**, 51—66 (1966). — 52. Merton, P. A.: Problems of muscular fatigue. Brit. med. Bull. **12**, 219—221 (1956). — 53. Nooney, G. C.: Allocation of errors to theory and experiment. J. theoret. Biol. **10**, 46—53 (1966). — 54. Otsuka, M., M. Endo, and Y. Nonomura: Presynaptic nature of neuromuscular depression. Jap. J. Physiol. **12**, 573—584 (1962). — 55. Palade, G. E., and S. L. Palay: Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. Anat. Rec. **118**, 335 (1954). — 56. Reger, J. F.: The fine structure of neuromuscular synapses of gastrocnemii from mouse and frog. Anat. Rec. **130**, 7—24 (1958). — 57. Robertson, J. D.: The ultrastructure of a reptilian myoneural junction. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 381—394 (1956). — 58. Robertson, J. D.: Electron microscopy of the motor end-plate and the neuromuscular spindle. Amer. J. phys. Med. **39**, 1—43 (1960). — 59. Sandweg, R., H. Bauer u. P. Kruckenberg: Unveröffentlichte Beobachtungen. — 60. Takeuchi, A.: The long-lasting depression in neuromuscular transmission of frog. Jap. J. Physiol. 8, 102—113 (1958). — 61. Takeuchi, A., and N. Takeuchi: Changes in potassium concentration around motor nerve terminals, produced by current flow, and their effects on neuromuscular transmission. J. Physiol. (Lond.) **155**, 46—58 (1961). — 62. Thies, R. E.: Neuromuscular depression and the apparent depletion of transmitter in mammalian muscle. J. Neurophysiol. **28**, 427 (1965).

P. Kruckenberg
Physiologisches Institut der Freien Universität Berlin
1000 Berlin 33, Arnimallee 22

Universitätsdruckerei H. Stürtz AG Würzburg

Lebenslauf

Am 5.3.1939 wurde ich als Sohn des Textilkaufmanns Heinrich Kruckenberg und seiner Ehefrau Luise, geb. Adermann in Berlin geboren. In Berlin-Tegel besuchte ich die Grund- und die Oberschule und legte 1958 an der Humboldt-Schule das Abitur ab.
1955/56 war ich als Austauschschüler des American Field Service ein Jahr in den USA und erwarb dort das High School Diploma.
Ich studierte zunächst an der Freien Universität Physik und Mathematik, setzte aber nach dem Vordiplom (1961, mit der Note "sehr gut") allein das Medizinstudium fort, nachdem ich seit 1960 in der Medizinischen Fakultät inscribiert war. 1962/63 studierte ich drei Semester an der Universität München, danach wieder an der FU. Seit 1964 bin ich Mitglied der Studienstiftung des Deutschen Volkes.
Physikum (1963) und Staatsexamen (1967) bestand ich mit der Note "sehr gut". Seit 1963 habe ich in Physiologischen Instituten - zuerst in München mit biochemisch-histochemischer Methodik, dann in Berlin mit elektrophysiologischer Methodik - über die motorische Endplatte gearbeitet.

Berlin, den 6.8. 1967